

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 126

**Activité antivirale
sur les Coxsackievirus B
de mycéliums d'Homobasidiés en culture pure**

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 15 Décembre 1977

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

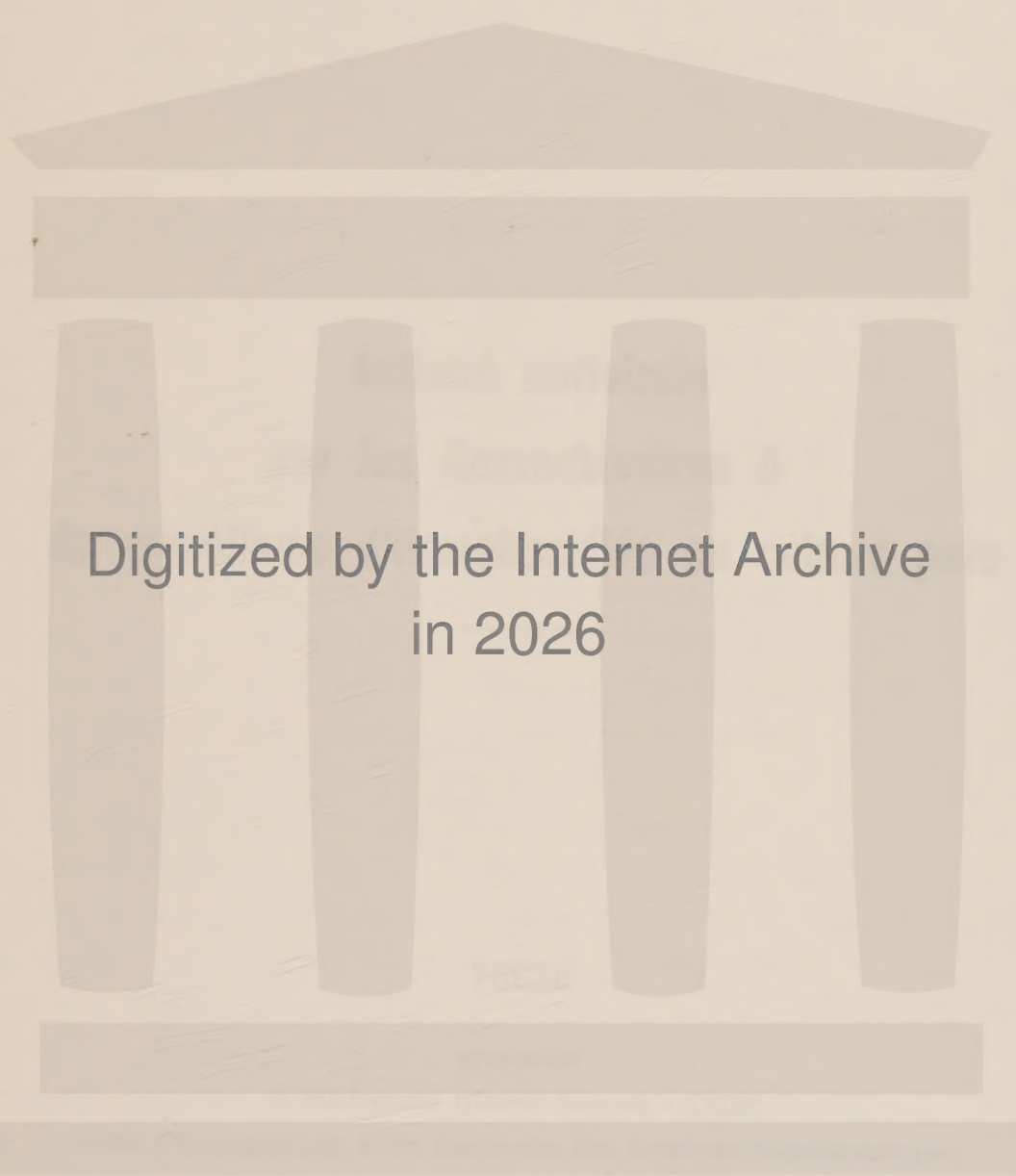
par

VILLARD Jean

né le 30 Septembre 1941

à LYON (3°)

29



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554224_0011

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N°

**Activité antivirale
sur les Coxsackievirus B
de mycéliums d'Homobasidiés en culture pure**

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 15 Décembre 1977

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

par

VILLARD Jean

né le 30 Septembre 1941

à LYON (3°)



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

U.E.R. de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Monsieur le Pr Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de MATHEMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. des SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. des SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de PHYSIQUE NUCLEAIRE : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT.

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : Monsieur le Professeur Lucien ODDOUX

Assesseurs : Monsieur le Professeur J. BOIDIN
Monsieur le Professeur H.J. POURRAT
Monsieur le Professeur M. CARRAZ
Monsieur G.A. DENOYEL.

A MA FEMME

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur Lucien ODDOUX
Directeur Honoraire de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques de Lyon

*Il nous a confié ce travail et
donné tous les moyens nécessaires à son accom-
plissement.*

*Ayant pu, au cours de nos
études, apprécier la clarté de son enseignement
et sa rigueur scientifique, nous avons toujours
trouvé auprès de lui un accueil chaleureux et
des encouragements permanents.*

*Nous lui exprimons ici notre
reconnaissance et l'assurons de notre respectueux
attachement.*

A NOS JUGES,

Monsieur le Professeur J. BOIDIN

Président Honoraire de l'Université Claude Bernard

Sa compétence est reconnue de tous dans le domaine de la Mycologie; nous ressentons le grand Honneur qu'il nous fait en siégeant dans notre Jury.

Nous le prions de bien vouloir accepter nos remerciements très respectueux et reconnaissants.

Monsieur le Professeur H.J. POURRAT

Professeur de Matière Médicale à la

Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand

Il a bien voulu accepter de juger notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde et très respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur M. CARRAZ
Directeur Honoraire de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques de Lyon
Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

*Nous le remercions sincèrement
de l'intérêt qu'il nous a toujours porté.*

*Avec l'assurance de notre
dévouement, qu'il veuille bien nous permettre
de lui exprimer notre reconnaissante amitié.*

Monsieur G.A. DENOYEL
Chef du Service des Virus à
l'Institut Pasteur de Lyon

*Nous sommes heureux d'avoir
trouvé en lui un ami dont l'aide constante et
sympathique a grandement facilité notre tâche.*

au Personnel du Laboratoire
de Cryptogamie et Phytopharmacie,

pour son amabilité et son dévouement.

au Personnel du Service des Virus
de l'Institut Pasteur de Lyon,

pour sa gentillesse et ses conseils.

S O M M A I R E

PREFACE

PREMIERE PARTIE : RECHERCHE SYSTEMATIQUE *IN VITRO* D'UNE ACTIVITE ANTIVIRALE

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

A, Matériel d'étude

B, Méthodes utilisées

- 1 - Culture du mycélium
- 2 - Obtention du liquide à tester
- 3 - Support vivant pour l'étude du virus
- 4 - Préparation de la suspension virale
- 5 - Méthodes de criblage.

CHAPITRE II : Résultats

- 1 - Examen des plaques
- 2 - Résultats
- 3 - Interprétation des résultats
discussion.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE *IN VIVO* DES MYCELIUMS ACTIFS *IN VITRO*
SUR LES COXSACKIEVIRUS B

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

A. Matériel d'étude

B. Méthodes utilisées

- 1 - Choix de la méthode d'inoculation de la souche virale à l'animal
- 2 - Signes cliniques dûs à l'infection par les Cocksackievirus B
- 3 - Préparation de l'inoculum infectieux
- 4 - Essais des liquides de culture fongique

CHAPITRE II : Résultats

- 1 - Résultats et interprétations
- 2 - Discussion.

TROISIEME PARTIE : ETUDE PARTICULIERE DE

MYCENA GALOPODA (PERS. EX FR.) KUMMER

CHAPITRE I : Descriptions du carpophore et du mycélium en culture

CHAPITRE II : Recherche de la méthode de culture optimale en vue de l'activité anticoxsackievirus B

- 1 - Influence des milieux de culture
- 2 - Influence des conditions de culture
- 3 - Cinétique d'apparition de l'activité antivirale.

CHAPITRE III : Etudes biologique et chimique du liquide de culture

- 1 - Etude de la toxicité
- 2 - Recherche d'une activité antivirale sur d'autres virus que le
Coxsackievirus B₁
- 3 - Essais d'extraction et de purification
- 4 - Conclusions.

CONCLUSIONS GENERALES.

P R E F A C E

Le monde des champignons est vaste; il serait vain d'essayer de le circonscrire tant les espèces qu'il contient sont différentes les unes des autres : la chanterelle, le champignon responsable du mildiou de la vigne, l'agent du "muguet" buccal, les moisissures, etc... possèdent en effet, non seulement une morphologie bien particulière, mais aussi des propriétés biochimiques et biologiques spécifiques.

De tout temps, les Hommes ont recherché dans ces "formes" de la Nature, le moyen de profiter du "bon" et de lutter contre le "mauvais". C'est ainsi que les siècles ont vu se développer l'étude de la comestibilité des "gros champignons", des propriétés de certains "petits champignons" intéressant par exemple les industries alimentaires, tandis que plus récemment, était entreprise la recherche d'espèces fongiques capables de lutter efficacement contre les agents pathogènes qui nous assaillent : bactéries, parasites de toutes sortes, virus.

Dans la lutte contre les bactéries, ce fut très vite le succès. Point n'est besoin de rappeler la découverte de la pénicilline, par FLEMING, ni celle de très nombreux antibiotiques antibactériens isolés ou métabolisés à partir des champignons.

Le plus grand nombre des espèces fongiques qui ont permis d'obtenir des antibiotiques utilisables en thérapeutique humaine ou animale appartiennent aux Micromycètes.

De nombreux Macromycètes aussi -en particulier des Basidiomycètes- ont été étudiés en vue d'une recherche de propriétés antibiotiques. Dès 1944, WILKINS et HARRIS, suivis en 1945 par ROBBINS et son école américaine, puis par ODDOUX à partir de 1954 ont mis en évidence des substances à activité antibactérienne *in vitro* : aucune, à notre connaissance, n'a pu être utilisée en thérapeutique car toutes se sont révélées, à des degrés divers, toxiques pour les animaux de laboratoire.

Contre les champignons pathogènes pour l'Homme ou les végétaux, des espèces à activité antifongique ont été aussi découvertes et ont abouti par exemple, dès 1939 (OXFORD, RAISTRICK et SIMONART) à l'isolement de la griséofulvine dont l'utilisation thérapeutique à partir de 1958 a permis de diminuer considérablement la gravité des dermatophyties humaines. Ici encore, les Macromycètes ont été peu étudiés et n'ont pas permis la réalisation d'antifongiques applicables aux mycoses humaines.

Quant aux virus, la complexité de leur biologie et le peu de connaissances que nous possédions au début de ce siècle de leurs propriétés les ont fait, pour ainsi dire, délaissé par les chercheurs.

Deux découvertes, celle (ENDERS, 1949) de l'aptitude du virus de la poliomyélite à se multiplier dans les cellules humaines cultivées *in vitro*, puis en 1952 l'isolement de la première souche de cellules en lignée continue obtenues à partir de néoplasmes humains, ont permis l'essor de la virologie et, partant, ouvert la voie à la recherche des activités antivirales.

C'est à l'école japonaise que revient le mérite d'avoir été la pre-

mière à défricher ce nouveau domaine.

TAKATSUKI et coll. (1968-1969-1971) isolent ainsi d'une culture d'*Aspergillus* sp. la xanthocilline mono- et diméthyléther et la méthoxy-xanthocilline diméthyléther, toutes deux dotées d'une activité antivirale sur le système fibroblastes de poulet- virus de Newcastle, et d'un fort pouvoir inhibiteur de la synthèse protéique. KATO et coll. (1969), après avoir trouvé dans l'oryzachlorine (antifongique spécifique vis-à-vis de nombreuses levures, isolé d'*Aspergillus oryzae*) une faible activité antivirale *in vitro*, caractérisent le paecilomycérol, un nouvel antibiotique antiviral stéroïdique, produit à partir de *Paecilomyces elegans*, dont la forte activité *in vitro* seulement s'exerce vis-à-vis du virus de Newcastle et du virus herpétique.

Enfin en 1971, SUZUKI montre les propriétés antitumorales et antivirales de l'acide pénicillique.

Parallèlement les études *in vitro* menées à partir des cultures de *Penicillium stoloniferum* permettent séparément à WILLIAMS et coll. (1968), PLANTEROSE (1969) et NOTO et coll. (1969) de révéler une activité antivirale et antitumorale de l'acide mycophénolique.

Comme nous venons de le voir, toutes les recherches, le plus souvent *in vitro*, n'ont porté pratiquement que sur des Micro-mycètes. Rares ont été les expérimentations sur les Homobasidiés; citons cependant les travaux de LAMAISSON (1974) et GERMAN, LAMAISSON et POURRAT (1974) qui mettent en évidence, dans les carpophores de *Psalliota xanthoderma* Genev., une glycoprotéine dotée d'une activité antivirale à l'encontre des virus Sindbis, herpétiques et du virus de la vaccine. Nous avons cru également intéressant d'étendre cette étude à la recherche d'autres champignons capables de synthétiser des substances à activité antivirale et de tester les espèces éventuellement actives sur un animal de laboratoire.

Mais si les champignons microscopiques sont d'une étude relativement facile car la recherche de leurs propriétés antibiotiques s'effectue

aisément sur leurs mycéliums en culture, il n'en est pas de même pour les Basidiomycètes. En effet, la courte durée de la poussée fongique et les aléas climatiques quant à l'apparition des carpophores sont un sérieux handicap pour les chercheurs qui s'intéressent aux Homobasidiés, car ils doivent avoir à leur disposition un matériel d'expérimentation en quantité suffisante et en temps voulu. C'est la raison pour laquelle les mycologues se sont intéressés aux mycéliums des Macromycètes cultivés au laboratoire.

Leur culture a été entreprise à partir de la germination des spores et a donné de très bons résultats. Mais l'impossibilité de cultiver un grand nombre d'espèces par cette méthode a conduit KÜHNER (1946) à bouturer des fragments d'hyménium, technique reprise par ODDOUX (1957) qui réalisa ainsi depuis cette date une mycothèque très riche -en particulier d'Agaricales- au sein de son laboratoire.

Ayant le privilège de pouvoir utiliser cette précieuse collection, nous avons entrepris une recherche systématique de l'activité antivirale de ces mycéliums en culture.

PREMIERE PARTIE

RECHERCHE SYSTEMATIQUE *IN VITRO*
D'UNE ACTIVITE ANTIVIRALE

Le principe général de cette recherche est de mettre en contact un liquide de culture mycélienne contenant les produits du métabolisme du champignon avec une suspension de virus. A l'aide d'un support vivant, tel que des cellules humaines par exemple, il nous sera possible de juger si ce champignon possède ou non une action antivirale.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL D'ETUDE

Afin de mener à bien une telle recherche, il faut avoir en permanence à sa disposition de nombreuses cultures fongiques et une suspension de virus.

1. ESPECES DE CHAMPIGNONS ETUDIES

Nous avons pu, au cours de nos travaux, disposer d'un très grand nombre de souches différentes de Basidiomycètes (en particulier d'Agaricales), dont la liste complète figure dans les pages suivantes.

Au total, 231 souches ont été étudiées, représentant 205 espèces différentes. Chaque souche est identifiée par un numéro, précédé ou non d'une lettre majuscule.

Nous remercions Monsieur le Professeur R. KÜHNER qui a eu l'obligeance de nous remettre les 14 cultures d'espèces différentes d'Agaricales identifiées par la lettre K suivie du numéro que nous avons affecté à la souche, ainsi que Monsieur le Professeur J. BOIDIN à qui nous devons les 28 espèces d'Aphyllophorales dont nous avons conservé le numéro d'origine de la souche, précédé de la lettre B.

Les numéros non précédés d'une lettre représentent les souches de la collection réalisée dans le laboratoire de Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Lyon par Monsieur le Professeur L. ODDOUX.

Les listes qui suivent présentent les espèces étudiées selon la nomenclature et la classification de SINGER pour les Agaricales (R. Singer, 1962) et celles d'AINSWORTH, SPARROW et SUSSMAN (1973) pour les Aphyllophorales.

AGARICALES

- 1189 *Phyllotopsis nidulans* (Pers. ex Fr.) Sing.
670 *Pleurotus eryngii* (D.C. ex Fr.) Quél.
2003 " *ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer
1190 " *salignus* Fr.
2004 *Panus suavissimus* (Fr.) Sing.
237 *Lentinus variabilis* Schulzer apud Quél.
283 *Schizophyllum commune* Fr.
1149 *Hygrophorus eburneus* (Bull. ex Fr.) Fr.
1028 *Lyophyllum infumatum* (Bres.) Kühner
1170 " *aggregatum* (Schaeff. ex Secr.) Kühner
2005 *Calocybe constricta* (Fr.) Kühner
713 " "
1281 " *leucocephala* (Fr. ss. Lange) Kühner
K 132 " *georgii* (Clusius ex Fr.) Kühner same as *C.gambosa* (Fr.) Sing.
1154 *Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.) Berk & Br. var. *bicolor* R. Maire
1248 *Clitocybe gilva* (Pers. ex Fr.) Kummer
605 " *diatreta* (Fr.) Kummer
748 " *odora* (Bull. ex Fr.) Kummer
1284 " *pityophila* (Secr.) Gill.
K 72 " "
749 " cf *cerussata*

- 967 *Clitocybe candicans* (Pers. ex Fr.) Kummer
- K 69 " *gibba* (Pers. ex Fr.) Kummer
- K 70 " "
- 1010 " *nebularis* (Batsch ex Fr.) Kummer
- 747 " "
- 1020 " *decembris* Sing.
- 1052 " "
- K 117 " *inornata* (Sow. ex Fr.) Gill.
- 835 " *splendens* (Pers. ex Fr.) Qué1. ss. Bres.
- 971 " *suaveolens* (Schum. ex Fr.) Kummer
- 744 " *dealbata* (Sow. ex Fr.) Gill.
- 969 " "
- 292 " *litua* (Fr.) Métrod
- 113 " *hydrogramma* (Bull. ex Fr.) Kummer
- 391 " *lignatilis* (Pers. ex Fr.) Karst.
- K 94 " sp.
- 1280 " *olearius* (D.C. ex Fr.) Sing.
- 1249 " "
- 1102 " *rivulosa* (Pers. ex Fr.) Kummer
- 128 *Lepista sordida* (Fr.) Sing.
- 400 " *nuda* (Bull. ex Fr.) Cooke
- 1069 " "
- 998 " *luscina* (Fr.) Sing.
- K 95 " "

- 1202 *Lepista personata* (Fr. ex Fr.) Cooke
168 *Tricholomopsis platyphylla* (Pers. ex Fr.) Sing.
141 " *trigonosporum* (Bres.) Ricken
1198 " *irinum* (Fr.) Kummer
901 " *vaccinum* (Pers. ex Fr.) Kummer
1074 " *ustaloides* Romagn.
891 " *album* (Schaeff. ex Fr.) Kummer
1278 " "
898 " *orirubens* Q.
1072 " *albobrunneum* (Pers. ex Fr.) Kummer
1003 " *equestre* (L. ex Fr.) Quél.
958 " *cingulatum* (Almfelt ex Fr.) Jacobasch
1205 " *acerbum* (Bull. ex Fr.) Quél. ss. Bres.
1209 " *sculpturatum* (Fr.) Quél. ss. Bres.
K 147 *Resupinatus unguicularis* (Fr.) Sing.
1024 *Hohenbuehelia geogenius* (D.C. ex Fr.) Sing.
968 *Pseudoclitocybe cyathiiformis* (Bull. ex Fr. p.p.) Sing.
1011 *Melanoleuca graminicola* (Vel.) Kühner & Maire
847 " "
1176 " *melaleuca* (Pers. ex Fr.) Murr.
647 *Lentinellus bisus* (Quél. apud Bres.) Kühner & Maire
K 152 *Armillaria fusipes*
355 *Collybia butyracea* (Bull. ex Fr.) Quél.
972 " "
973 " *distorta* (Fr.) Quél.

K 82 *Collybia distorta* (Fr.) Quél.

750 " *dryophila* (Bull. ex Fr.) Kummer

1273 " "

94 " *confluens* (Pers. ex Fr.) Kummer

2009 " "

656 " *peronata* (Bolt. ex Fr.) Kummer

933 " "

935 " "

993 " "

259 *Panellus serotinus* (Pers. in Hofmann ex Fr.) Kühner

1274 *Oudemansiella radicata* (Relh. ex Fr.) Sing.

1109 " *longipes* (Bull. ex St Amans) Moser

607 *Pseudohiatula conigenoides* (Ellis) Sing.

1175 *Marasmius perforans* (Hofm. & Fr.) Sing.

840 " *Buxi* Fr. in Quél.

1047 " *oreades* (Bolt. ex Fr.) Fr.

153 " *alliaceus* (Jacq. ex Fr.) Fr.

240 " *inodorus* Pat.

241 " *rotula* (Scop. ex Fr.) Fr.

934 " *ramealis* (Bull. ex Fr.) Sing.

96 " *globularis* Fr. in Quél.

2008 " *prasiosmus* (Fr.) Fr.

1262 " *bresadolae* (Kühn. & Romagn.) Sing.

1277 " "

1173 " *dryophilus* (Bull. ex Fr.) Kummer

- 1119 *Crinipellis stipitarius* (Fr.) Pat.
- 103 *Mycena pura* (Pers. ex Fr.) Kummer
- K 93 " *rosella* [(Fr.) Kummer sensu Schroeter, and (if identical)
sensu A.H. Smith]
- 994 " *fagetorum* (Fr.) Gill.
- 855 " *galopoda* (Pers. ex Fr.) Kummer
- 1178 " "
- 1177 " *epipterygia* (Scop. ex Fr.) S.F. Gray
- 937 " *epipterygioides* Pearson
- 849 " *aetites* (Fr.) Quél. ss. Ricken
- 1183 " *rorida* (Scop. ex Fr.) Quél.
- 244 " *crocata* (Schrader ex Fr.) Kummer
- 245 " *elegans* (Pers. ex Fr.) Kummer ss. Kühner
- 246 " *flavoalba* (Fr.) Quél.
- 539 " *alcalina* (Fr.) Kummer ss. Schroeter, Kühner, A.H. Smith
- 544 " *iodiolens* Lund.
- 382 " *sanguinolenta* (A. & S. ex Fr.) Kummer
- 102 " *inclinata* (Fr.) Quél. ss. Kühner
- 1181 " *polygramma* (Bull. ex Fr.) S.F. Gray ss. Lange
- 1008 *Xeromphalina caulicinalis* (With. ex Fr.) Kühner & Maire
- 249 " *campanella* (Batsch ex Fr.) Kühner & Maire
- 1049 *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Pers. ex Hooker
- L 14 " *eliae* Quél.
- 1041 *Pluteus curtisii* (Berk. ex Br.) Sacc.
- 834 *Macrolepiota procera* (Scop. ex Fr.) Sing.

- 1026 *Macrolepiota procera* (Scop. ex Fr.) Sing.
 1276 " *rhacodes* (Vitt.) Sing.
 85 *Leucoagaricus excoriatus* (Schaeff. ex Fr.) Sing.
 672 *Agaricus xanthodermus* Genevier
 1044 " "
 1266 " *bisporus* (Lange) Imbach
 1192 " *augustus* Fr.
 1030 " *campestris* L. ex Fr.
 1068 *Agaricus silvicola* (Vitt.) Peck
 2006 " *silvaticus* Schaeff. ex Secr. ss. Krombholz
 1040 *Lepiota micropholis* (Berk. & Br.) Sacc.ss. Locquin vix Berk. & Br.
 K 79 " sp.
 869 *Phaeolepiota aurea* (Mattuschka ex Fr.) R. Maire ex Konr. & Maubl.
 612 *Coprinus lagopus* Fr.
 2001 " *comatus* (Müller in Flora Dan. ex Fr.) S.F. Gray
 1275 " *atramentarius* (Bull. ex Fr.) Fr.
 621 *Psathyrella hydrophila* (Bull. ex Fr.) Maire in Maire & Werner
 622 " *gracilis* (Fr.) Quél.
 279 " *sarcocephala* (Fr.) Sing.
 126 " *pennata* (Fr.) Konrad & Maublanc (ss. Ricken)
 1042 " sp.
 557 *Panaeolus papilionaceus* (Bull. p.p.ex Fr. 1821 p.p.em.Fr.1838) Quél.
 162 *Agrocybe dura* (Bolt. ex Fr.) Sing.
 871 " *aegerita* (Brig.) Sing.
 999 *Stropharia aeruginosa* (Curt. ex Fr.) Quél.
 1265 " "

- 634 *Stropharia semiglobata* (Batsch ex Fr.) Quél.
1139 " *coronilla* (Bull. ex Fr.) Quél.
493 *Naematoloma capnoides* (Fr.) Karst.
2002 " "
365 " *fasciculare* (Huds. ex Fr.) Karst.
1132 *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Kummer
872 " *aurivella* (Batsch ex Fr.) Kummer
55 " *alnicola* (Fr.) Sing.
59 " *spumosa* (Fr.) Sing.
1130 " *lucifera* (Lasch) Quél.
793 " *graminis* (Quél.) Sing.
481 " *albocrenulata* (Peck) Sacc.
1131 *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff. ex Fr.) Sing. & Sm.
802 *Hebeloma edurum* Métrod
K 86 " *radicosum* (Bull. ex Fr.) Ricken
804 " *sinapizans* (Paulet ex Fr.) Gill.
2007 " *spoliatum* Fr.
1144 " *crustuliniforme* (Bull. ex St Am.) Quél.
794 *Phaeomarasmium limulatus* (Fr. ex Weinm.) Sing.
1283 *Cortinarius rufo-olivaceus* (Pers. ex Fr.) Fr.
1254 " *praestans* (Cordier) Sacc.
1143 *Gymnopilus hybridus* (Fr. ex Fr.) Sing.
257 " *spectabilis* (Fr.) Sing.
800 " *picreus* (Fr.) Karst.
797 *Galerina mycenopsis* (Fr.) Kühner ss. Kühner
946 " *marginata* (Batsch ex Fr.) Kühner

- 1134 *Galerina marginata* (Batsch ex Fr.) Kühner
980 " "
K 92 " *mmiophila* (Lasch) Kühner
2 " *paludosa* (Fr.) Kühner
1118 *Crepidotus variabilis* (Pers. ex Fr.) Kummer
786 " *applanatus* (Pers. ex Fr.) Qué1.
415 *Clitopilus pinsitus* (Fr. ss. Romagn.) Joss.
1272 " *prunulus* (Scop. ex Fr.) Kummer
1012 *Rhodophyllum mammosus* (Fr.) Qué1.
883 " *nitidus* Q.
740 " *byssisedus* (Pers. ex Fr.) Qué1.
949 " *cetratus* ss. Ricken
20 *Hygrophoropsis aurantiaca* (Wulfen ex Fr.) R. Maire
1188 *Paxillus involutus* (Batsch ex Fr.) Fr.
1285 " *panuoides* (Fr. ex Fr.) Fr.
1141 *Gomphidius glutinosus* (Schaeff. ex Fr.) Fr.
1287 *Suillus grevillei* (Klotzch) Sing.
12 " *granulatus* (L. ex Fr.) O. Kuntze
1268 *Lactarius hepaticus* Plowright apud Boudier
1261 " *torminosus* (Schaeff. ex Fr.) Gray
1260 " *controversus* (Pers. ex Fr.) Fr.

APHYLLOPHORALES

- B 5291 *Podoscypha nuda* Boidin
B 6035 " *involuta* (Klotzch) Imaz.
B 5444 *Scytinostroma luteolum* Boidin
B 6472 " *portentosum* (Berk. & Curt.) Donk.
B 6665 " *galactinum* (Fr.) Donk.
B 4076 *Coniophora arida* (Fr.) Karst.
B 2443 *Hericium coralloides* (Scop. ex Fr.) S.F. Gray
B 5559 *Gloeodontia discolor* (Berk. & Curt.) Boidin
B 6031 *Punctularia tuberculosa* Pat.
B 673 *Stereum gausapatum* (Fr.) Fr.
B 3915 " *ostrea* (Blum & Nees) Fr.
B 111 *Amylostereum chailletii* (Pers. ex Fr.) Boidin
B 4905 " *laevigatum* (Fr.) Boidin
B 4421 *Xylobolus subpileatus* (Berk. & Curt.) Boidin
B 6551 *Veluticeps Berkeleyi* Cooke
B 737 *Peniophora incarnata* (Pers. ex Fr.) Karst.
B 3203 " *pini* (Schleich. ex Fr.) Boidin
B 4198 " *nuda* (Fr.) Bres.
B 4439 " *violaceo-livida* (Sommerf.) Karst.
B 3829 *Phanerochaete velutina* (D.C. ex Fr.) Parm.
B 4332 *Aleurocystidiellum subcruentatum* (Berk. & Curt.) Lemke

- B 3306 *Leucogyrophana mollusca* (Fr.) Pouzar
- B 4668 *Metulodontia roumegueri* (Bres.) Parm.
- B 5284 *Gloeocystidiellum flammeum* Boidin
- B 6552 "*Odontia*" *nothofagi* G.H. Cunn.
- B 6576 *Merulius aureus* (Fr.)
- B 6708 *Steccherinum rhois* (Schw.) Banker
- B 5745 *Donkia pulcherrima* (Berk. & Curt.) Pilat

2. VIRUS UTILISE

Nous avons opté pour un type de virus aisé à manipuler et se développant bien sur des cellules en lignée continue, ce qui exclut déjà les virus se multipliant sur les cultures primaires ou les oeufs embryonnés.

Ces conditions limitaient le choix aux trois familles suivantes :

- les Virus herpétiques
- les Adénovirus
- les Entérovirus.

Il nous a semblé intéressant d'utiliser, au premier abord, un virus herpétique. C'est un virus oncogène qui fait actuellement l'objet de nombreuses recherches car il a été associé aux néoplasies du col utérin chez la femme. Il se développe bien sur cellules en lignée continue.

Il est cependant fragile et possède un pouvoir pathogène expérimental très difficile à mettre en évidence (cornée de lapin) dans un laboratoire non spécialisé en virologie. C'est la raison pour laquelle l'herpès n'a pas été utilisé pour cette recherche systématique. Il conviendrait cependant de poursuivre dans cette voie car ce virus à DNA devient de plus en plus important en pathologie humaine.

Les Adénovirus sont également des virus à DNA et ont l'avantage d'être assez résistants. Leur développement est facile sur cultures cellulaires (KB ou HeLa), mais l'absence de pouvoir pathogène expérimental nous les a fait rejeter.

Restaient alors les Entérovirus, qui sont des virus à RNA peu fragiles; ils constituent un groupe important comprenant les virus poliomyélitiques, Cocksackie et ECHO. En excluant évidemment les virus poliomyélitiques et les Echovirus qui ne possèdent pas de pouvoir pathogène expérimental, nous avons cherché dans les Cocksackievirus, celui qui correspondait le mieux à notre travail.

- les Cocksackievirus groupe A, ne poussant pas en général sur cultures cellulaires en lignée continue, n'ont pas été retenus;
- les Cocksackievirus groupe B se développent bien sur cellules, sont pathogènes pour un animal relativement facile à obtenir au laboratoire : le souriceau nouveau-né; de plus, la révélation du pouvoir pathogène est rapide puisque la mort intervient entre le deuxième et le troisième jour.

Nous avons donc décidé de fixer notre choix sur un des six sérotypes du groupe B des Cocksackievirus :

le virus Cocksackie B sérotype 1.

2-1 - Description sommaire; rappels

Les Cocksackievirus sont de petits virus (27 mμ), sans enveloppe; ils possèdent une structure à symétrie icosaédrique. Ils sont composés de 32 capsomères, un à chaque sommet (12) et un au centre de chaque face (20). Leur seul type d'acide nucléique est un acide ribonucléique monocaténaire. Ils contiennent 25 pour cent de RNA et 75 pour cent de protéines, mais ne renferment ni glucides, ni lipides.

Ils sont actuellement représentés par 23 sérotypes A et 6 sérotypes B.

Le sérotype retenu pour toutes les expérimentations qui vont suivre est le

Coxsackie B₁ (Entérovirus n° 27). Souche prototype : Connecticut-5

2-2 - Syndromes cliniques sommaires; rappels

Sauf en ce qui concerne le Coxsackievirus B sérotype 6, les autres sérotypes du groupe B donnent des syndromes cliniques identiques. Il s'agit principalement :

- d'une myalgie épidémique dont la forme clinique la plus connue est la maladie de BORNHOLM,
- de cardiopathies, myocardite du nourrisson, péricardite,
- d'encéphalo myocardites du nourrisson, évoluant le plus souvent vers la mort,
- de manifestations cutanéo-muqueuses, conjonctivite,
- d'affections respiratoires hautes et d'affections digestives,
- de méningites lymphocytaires

B - METHODES UTILISEES

1 - CULTURE DU MYCELIUM

Toutes les souches fongiques contenues dans la mycothèque du laboratoire -elles représentent un nombre très important d'espèces différentes- sont conservées à l'état de mycéliums, dans des tubes contenant un milieu de croissance gélosé, stockées en chambre obscure à la température constante de + 4°C.

1-1 - Entretien des souches

Il est réalisé par le "repiquage" annuel de toutes les espèces sur le milieu "L" gélosé (ODDOUX, 1960), de formule :

Glucose pur	16,50 g
Extrait de malt	3,50 g
Tartrate neutre d'ammonium ..	0,35 g
l-asparagine	0,50 g
Hydrolysate de caséine	0,50 g
KH_2PO_4	0,50 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g
Gélose lavée et filtrée	10 g
Eau distillée Q.S.P.	1 litre

Nous indiquons ci-dessous l'origine des produits entrant dans la composition du milieu :

- Glucose pur anhydre : Coopération Pharmaceutique Française
Melun. Réf.: B 16450
- Gélose : Agar-Agar : Coopération Pharmaceutique Française
Melun. Réf.: E 52931 A
- Malt extract Broth. DIFCO Laboratories. DETROIT 1, Michigan
(U.S.A.) Réf.: 490674
- Casein-Hydrolysat enzymatisch. FLUKA A.G., Busch S.G. (Suisse)
Réf.: 22090
- Les acides aminés et les sels minéraux sont des "produits
pour laboratoires R.P.pour analyse"
RHÔNE-POULENC, vendus par les Etablissements PROLABO-PARIS.

Ce milieu de culture, réparti dans des tubes à ensemencement, est stérilisé à l'autoclave à 116°C pendant 20 minutes et mis à refroidir en ayant soin d'incliner les tubes de 30 degrés environ de manière à obtenir une surface solide inclinée, donc de plus grande superficie. La durée de croissance du mycélium varie, suivant les espèces, entre 15 et 30 jours

1-2 - Matériel et milieux utilisés

La culture des mycéliums est réalisée dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml à col étroit, préalablement lavées au mélange sulfochromique et abondamment rincées à l'eau du robinet puis à l'eau distillée.

Nous introduisons dans chaque fiole 25 ml de milieu "L", sans gélose. L'ensemble est stérilisé à l'autoclave à 116°C pendant 20 minutes. Le pH du milieu est égal à 6, après refroidissement.

1-3 - Ensemencement

Les erlenmeyers sontensemencés à l'aide d'une öse, en ayant soin de prélever dans la zone marginale de la culture, représentant donc les parties jeunes et en pleine croissance. L'opération se fait stérilement, dans une chambre aseptique sous exposition de lampes bactéricides ou sous une hotte à flux laminaire horizontal. La taille des morceauxensemencés revêt une importante toute particulière. Nous avons en effet constaté qu'il valait mieux immerger plusieurs petits morceaux qu'un seul gros, afin d'augmenter au maximum la surface de mycélium en contact avec le milieu nutritif.

Les erlenmeyers sont bouchés à l'aide de coton cardé et mis immédiatement sur un agitateur rotatif placé dans une chambre de culture, à l'obscurité, à température fixe de 24°C et au taux d'hygrométrie constant de 70 pour cent. Cet agitateur*, pouvant supporter 9 plateaux de 60 erlenmeyers chacun (soit 540 fioles au total, fixées par des tulipes) est animé d'un mouvement rotatif de 10 cm de diamètre et de vitesse variable que nous fixons à 250 tours-minute.

Les erlenmeyers sont ainsi agités, 24 heures sur 24, pendant une durée qui est fonction de la quantité de mycélium présent dans la fiole ou de la coloration du liquide de culture : elle varie en général de 18 à 30 jours.

* Agitateur NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC. Référence G-53
vendu en France par P. BLOCK et Cie (STRASBOURG-MEINAU)

2 - OBTENTION DU LIQUIDE A TESTER

Les mycéliums ainsi cultivés en "milieu agité" se présentent sous forme de nombreuses petites boules plus ou moins rondes ou aplaties, lisses ou hérissées d'hyphes, suivant l'espèce considérée. Ces amas de filaments baignent dans le liquide constitué par le reliquat des produits du milieu de culture ainsi que les substances excrétées, élaborées ou transformées par le mycélium lui-même. Le pH final, différent suivant les espèces, est toujours acide, variant généralement entre 2 et 5.

2-1 - Séparation du mycélium du liquide de culture

Afin d'extraire au maximum tous les produits de métabolisme qui pourraient encore se trouver entre les hyphes mycéliennes, chaque flacon de culture est porté à la température de -70°C ; le contenu est ensuite décongelé. Le mélange mycélium-liquide de culture est filtré sur papier en cage stérile, sous exposition de lampes bactéricides, de manière à séparer aseptiquement les boules de mycélium du liquide contenant les produits de sécrétion.

Ce liquide de culture est alors neutralisé à pH 7.

2-2 - Stérilisation

Elle s'effectue par filtration à travers des membranes contenues dans un dispositif fixé à l'extrémité d'une seringue^{*}. Celle-ci

^{*} Sartorius France S.A.R.L., 11 Avenue du 1er Mai, B.P. 27,
91122 PALAISEAU CEDEX Réf. : SM 166 18.

est munie d'un robinet à trois voies^{*} permettant le prélèvement aseptique du liquide de culture d'un erlenmeyer, et l'introduction de ce même liquide dans un tube à hémolyse stérile, après passage à travers les filtres. Les ensembles de filtration (Sweenex^{**}) sont munis de filtres en nitrate de cellulose^{***} de différentes porosités et stérilisées à l'autoclave à 120°C pendant une heure. La seringue, le robinet à trois voies et les tubulures en "versilic" sont stérilisés à l'alcool à 70° et rincés à l'eau distillée stérile.

Remarque : même après filtration sur papier, il reste encore de nombreux filaments mycéliens qui obturent souvent les filtres stérilisants. Il convient donc, dans la plupart des cas, de commencer par utiliser un préfiltre, puis plusieurs filtres de porosité de plus en plus fine : 3 μ - 1,2 μ - 0,45 μ et enfin une membrane (0,2 μ) qui confère au liquide de culture une stérilité bien suffisante^{****}.

Le liquide à étudier est alors réparti dans des tubes à hémolyse stériles et conservé en chambre obscure à + 4°C.

*Sartorius France S.A.R.L., 11 avenue du 1er Mai, B.P.27

91122 PALAISEAU CEDEX Réf.:SM 166 39

** même origine Réf.:SM 162 14

*** même origine Réf.:SM 113 01

**** même origine préfiltre Réf.:SM 134 00

filtres Réf.:SM 113 0X

3 - SUPPORT VIVANT POUR L'ÉTUDE DU VIRUS

Au contraire des bactéries ou des agents pathogènes fongiques qui peuvent se développer sur un milieu inerte, les virus ont besoin, pour se reproduire, d'un matériel vivant; le support le plus facile à obtenir est la culture de cellules humaines : c'est ce matériel que nous employons.

3-1 - Choix des cellules en culture

En raison des tests à effectuer sur le virus Coxsackie type B, nous avons été amené à choisir une culture en lignée continue, en couche dite "monocellulaire". Ce sont des cellules humaines hétéroploïdes, sans limitation dans la multiplication, c'est-à-dire pratiquement "immortelles". Deux souches parmi les plus courantes ont été utilisées, toutes deux de nature épithéliale et d'origine néoplasique :

cellules HeLa : isolées en 1952 par GEY et coll. à partir d'implants de carcinome humain du col de l'utérus,

cellules KB : isolées en 1954 par l'action de la trypsine de fragments d'un carcinome du plancher de la bouche.

3-2 - Le matériel utilisé et sa préparation

Pour des raisons économiques, nous n'avons pas fait appel au matériel plastique à usage unique. Nous avons donc utilisé de la verrerie en verre ordinaire, moins chère que le Pyrex et qui donne d'aussi bons résultats à condition de la renouveler assez fréquemment. Les flacons dans lesquels se fait la culture des cellules sont soit des

flacons type "fiolle de pharmacie", soit des récipients type "fiolle de Roux". Nous avons utilisé presque exclusivement les flacons de 250 ml car ils possèdent de nombreux avantages :

- ils sont relativement de faible contenance et évitent une consommation trop importante de milieu de croissance très onéreux;
- ils permettent d'obtenir une nappe cellulaire de surface suffisante pour les tests;
- leur manipulation aisée diminue les risques de contamination au moment de la trypsination;
- employés en batterie, ils permettent de choisir la meilleure nappe de cellules au moment précis de son utilisation.

Ces flacons sont fermés à l'aide de bouchons métalliques vissés, munis à l'intérieur d'une rondelle de caoutchouc blanc.

Les récipients contenant les milieux de culture sont des flacons à sérum de 1 litre ou de 500 ml, bouchés à l'aide de bouchons en "versilic".

La désinfection de la verrerie (si elle a été contaminée par un virus) est réalisée par trempage pendant une nuit dans de l'eau de Javel diluée à 50 pour cent ou dans un soluté de formaldéhyde dilué au 1/5. Elle est ensuite rincée abondamment. Le lavage de la verrerie est une opération très importante, car un flacon mal lavé ou mal rincé entraîne d'une façon quasi certaine une toxicité importante pour les cellules en culture. Les flacons et les bouchons sont placés dans une machine à laver avec un programme bien défini à l'avance (neutralisation par injection automatique d'acide, nombreux rinçages à l'eau chaude, à l'eau froide, enfin à l'eau distillée).

La stérilisation du matériel se fait à l'autoclave à 120°C pendant une heure, en ayant soin auparavant d'envelopper les bouchons séparément dans une feuille d'aluminium.

La verrerie de petite dimension (pipettes Pasteur, tubes à hémolyse, etc...) est stérilisée au four Pasteur 1 heure à 180°C.

3-3 - Composition et préparation des milieux

Les différents milieux de croissance et la solution de trypsine ont, pour solution de base, la solution de HANKS.

Origine des produits utilisés

Les sels minéraux sont des produits R.P. vendus par les Etablissements Prolabo (PARIS).

L'eau bidistillée est fabriquée au laboratoire dans un appareil en quartz, Westdeutsche Quarzschmelze. GEESTHACHT, vendu en France par BIOBLOCK, 67400 Illkirch-Graffenstaden. Réf.: BD 15.

3-3-1 - Préparation de la solution de HANKS

Elle a pour base les solutions-mères suivantes :

<u>Solution A</u>	NaCl	100 g
	KCl	5 g
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2,5 g
	Eau bidistillée Q.S.P. ..	500 ml
<u>Solution B</u>	Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	0,75 g
	KH ₂ PO ₄	0,75 g
	Eau bidistillée Q.S.P. ..	500 ml
<u>Solution C</u>	CaCl ₂ anhydre	1,75 g
	ou	
	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	2,3 g
	Eau bidistillée Q.S.P. .	200 ml
<u>Solution D</u>	Glucose anhydre	20 g
	Eau bidistillée Q.S.P. .	100 ml
<u>Solution E</u>	NaHCO ₃	1,4 g
	Rouge de phénol	0,04 g
	Eau bidistillée Q.S.P... ..	100 ml

Pour constituer 1 litre de solution de HANKS, les solutions-mères sont mélangées dans les proportions suivantes :

Solution A	40 ml
Solution B	40 ml
Solution C	20 ml
Solution D	5 ml
Solution E	20 à 25 ml selon le pH désiré
Eau bidistillée Q.S.P.	1000 ml

3-3-2 - Préparation de la solution de trypsine à 0,25 %

A 2,5 g de trypsine^{*}, nous ajoutons peu à peu 1 litre de solution de HANKS, sans la solution E, tout en agitant vigoureusement. La solution ainsi obtenue est laissée au repos pendant 2 heures à + 4°C afin qu'elle se clarifie. Elle est ensuite stérilisée par filtration sur membrane SEITZ^{**} et stockée à - 20°C après répartition en flacons de 500 ml pour solutés injectables.

Parallèlement, nous préparons une solution de bicarbonate de sodium et rouge de phénol pour trypsine, de formule :

Rouge de phénol	0,04 g
NaHCO ₃	3,92 g
Eau bidistillée Q.S.P. ...	100 ml

elle est stérilisée par filtration sur membrane Seitz et stockée à + 4°C.

^{*}Trypsine 1:250 Réf.: 01 52-13 DIFCO Laboratories. DETROIT, Michigan(U.S.A)

^{**}Filtres stérilisants, disques EKS, COFRAM Seitz, 5 rue du Dr Jean Charcot
Z.I. Sud 91420 MORANGIS

Au moment de la trypsination, le contenu d'un flacon est décongelé et nous ajoutons extemporanément quelques millilitres de la solution bicarbonate-rouge de phénol jusqu'à coloration "pelure d'oignon". La solution ainsi obtenue est conservée à + 4°C pendant les quelques jours de son utilisation.

3-3-3 - Milieux de croissance utilisés

Deux milieux différents ont été utilisés au cours de nos travaux. Nous avons en effet commencé nos cultures cellulaires en utilisant le milieu en poudre à l'hydrolysate de lactalbumine base HANKS*, de formule :

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	0,06 g
CaCl ₂	0,14 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,10 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Glucose	1,00 g
Hydrolysate de lactalbumine.	6,50 g
Rouge de phénol	0,01 g
NaHCO ₃	0,30 g environ, suivant le pH désiré
Eau bidistillée Q.S.P. ...	1 litre

*Milieu de croissance. Réf.: 72625, fabriqué par l'Institut PASTEUR
Production, 25 rue du Dr Roux, 75015 PARIS.

Cette solution est stérilisée par filtration sur membrane Seitz, additionnée de 100 ml de sérum de veau stérile (le sang de veau* est centrifugé et le surnageant est filtré sur membrane Seitz) et d'une quantité définie d'antibiotiques :

Benzylpénicilline sodique**.... 10 000 U.I./ litre
Dihydrostreptomycine base*** .. 100 mg / litre

qui couvrent un spectre suffisamment large pour limiter au maximum les contaminations bactériennes les plus courantes.

Depuis un an environ, nous avons remplacé ce milieu de croissance par le milieu de Eagle MEM****, de formule :

mg	mg
L.arginine 105,00	Choline (chlorure) 1,00
L.cystine 24,00	Acide folique 1,00
L.glutamine 292,00	i.Inositol 2,00
L.histidine 31,00	Nicotinamide 1,00
L.isoleucine 52,50	D-pantothénate de calcium 1,00
L.leucine 52,40	Pyridoxal (chlorhydrate) 1,00
L.lysine 58,00	Riboflavine 0,10
L.méthionine 15,00	Thiamine (dichlorure) 1,00
L.phénylalanine ... 32,00	Rouge de phénol10,00
L.thréonine 48,00	Solution saline de Eagle Q.S.P 1 litre
L.tryptophane 10,00	(voir page suivante)
L.tyrosine 36,00	
Valine 46,00	

*Le sang de veau provient des abattoirs de Lyon-la-Mouche; il est vendu par les Etablissements COLLECTORGANE (LYON)

**Spécilline-G. 1 Million U.I. SPECIA (PARIS)

***Dihydrostreptomycine, Soluté injectable à 25 %. SPECIA (PARIS)

Milieu de croissance Réf.:72405, fabriqué par l'Institut PASTEUR Production
25 rue du Dr Roux, 75015 PARIS.

Cette solution est alors additionnée de 10 % de sérum de veau stérile*, ainsi que de Pénicilline et de Streptomycine dans les mêmes proportions que précédemment.

Solution saline de base Eagle

NaCl	6,8 g
KCl	0,4 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,14 g
Glucose	1 g
CaCl ₂	0,2 g
NaHCO ₃	2,2 g environ, suivant le pH désiré
Eau bidistillée Q.S.P. ..	1 litre.

3-4 - Entretien de la souche

Pour le transport de la souche au laboratoire, il faut prendre la précaution de remplir entièrement le flacon de milieu pour éviter une agitation trop forte qui risquerait d'endommager les cellules.

A l'arrivée, le flacon est vidé du surplus de milieu (1), puis placé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Lorsqu'il s'est formé une couche con-

(1) Nous n'employons pas plus de 50 ml de milieu de croissance pour un flacon de 250 ml, évitant ainsi que le liquide, lorsque le flacon est placé en position horizontale, n'entre en contact avec le bouchon, ce qui apporterait un risque de contamination supplémentaire.

* Sérum de veau stérile Réf.: 8 935 2, BIOMERIEUX, MARCY L'ETOILE (RHONE)

fluente de cellules, c'est-à-dire une couche "monocellulaire", cette nappe est détachée par action enzymatique de la trypsine en solution de HANKS. Cette solution est versée dans le flacon de cellules vidé de son milieu (environ 10 ml pour un flacon de 250 ml) et nous la laissons agir jusqu'à ce que la nappe commence à se décoller sur les pourtours (environ 3 à 4 minutes). La trypsine est alors éliminée, et les quelques gouttes qui restent dans le flacon continuent d'agir à l'étuve à 37°C. Au bout de quelques minutes, les cellules se détachent en lambeaux plus ou moins importants, bien décollés de la paroi de verre. Quinze millilitres environ de milieu de culture sont ajoutés dans le flacon et les lambeaux sont dissociés à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire, en aspirant et refoulant énergiquement, jusqu'à arriver à une suspension homogène de cellules bien séparées les unes des autres, dont on pratique une numération à l'aide d'un hématicimètre ou d'une cellule de Nageotte. Cette opération doit être effectuée pendant un temps suffisamment long car une dissociation incomplète ne permet que la multiplication des cellules marginales, entraînant ainsi la mort des cellules du centre du lambeau éventuellement existant.

La quantité de cellules habituellement utilisée varie évidemment en fonction de leur développement dans les différents flacons, mais elle oscille entre 2 et 3 millions de cellules pour une fiole de 250 ml.

Cette suspension homogène est répartie dans deux fioles nouvelles, auxquelles est rajouté un peu de milieu de croissance. La date de ce "dédoublément" est inscrite sur les flacons qui sont ensuite placés à 37°C .

Ces cultures sont examinées 2 fois par jour, matin et soir. Nous pouvons remarquer que les cellules se fixent très rapidement sur la paroi de verre (environ 6 à 8 heures après le dédoublément). Au bout de 24 heures, les cellules se sont multipliées d'une façon importante,

formant des flots de 20 à 30 cellules. Ce n'est qu'entre le deuxième et le troisième jour que ces flots deviennent confluent, formant ainsi une nappe continue en couche "monocellulaire".

Le milieu de croissance est changé au bout de 48 heures, puis tous les jours suivant la rapidité de multiplication des cellules.

Les cellules utilisées pour la conservation de la souche sont repiquées environ tous les 3 ou 4 jours. Celles utilisées pour réaliser les tests antiviraux sont prélevées au bout de 48 heures, aussitôt après que la couche continue soit formée.

4 - PREPARATION DE LA SUSPENSION VIRALE

La suspension virale qui a servi dès le début de nos travaux nous a été remise par le Service des Virus de l'Institut PASTEUR de Lyon. Conservée à -20°C et décongelée au moment de l'emploi, elle est constituée de millions de virions en suspension dans du milieu de HANKS. Le pH en est de 7,1.

4-1 - Entretien de la souche virale

Afin de posséder en permanence un stock suffisamment important de virus, nous avons été obligé de "repiquer" le virus Coxsackie pour en assurer la multiplication. Pour cela, nous disposons d'un flacon de 60 ml dont le fond est couvert d'une couche "monocellulaire" de cellules KB. Dès que les flots sont confluent, le milieu de croissance est éliminé et remplacé par du milieu de survie sans sérum. La dilution

de virus est alors introduite dans le flacon qui est placé à l'étuve bactériologique à 37°C. Au bout d'une durée qui varie avec le taux de dilution de la suspension utilisée, les cellules se séparent petit à petit de leurs voisines; elles ont un aspect rétracté, plissé, puis elles se détachent complètement de la paroi de verre : elles sont mortes. Lorsque la totalité de la nappe cellulaire est décollée, le liquide contenant les cellules mortes en suspension est centrifugé à 10°C pendant 20 minutes à la vitesse de 1500 tours/minute. Le surnageant est alors récupéré stérilement, additionné d'antibiotiques (10 U.I./ml de Pénicilline et 100 µg/ml de Streptomycine) et conservé à -20°C après répartition dans de petites ampoules stériles.

4-2 - Titration sur cellules

Sans vouloir procéder à une titration très précise des suspensions virales utilisées, il nous a cependant été nécessaire de connaître leur titre, au moins approximativement.

En effet, une suspension peut contenir beaucoup ou peu de virus et pourtant donner le même résultat, c'est-à-dire la mort de toutes les cellules, mais bien sûr en un laps de temps différent.

Si nous introduisons dans une cupule autant de virions qu'il y a de cellules, ou plus, chaque virion va pénétrer dans une cellule, et, en un seul cycle de multiplication (moins de 12 heures), toutes les cellules seront tuées, libérant ainsi 200 à 300 nouveaux virions par cellule. Si au contraire nous disposons d'une suspension virale plus diluée, les virions libérés par les cellules mortes après le premier cycle de multiplication vont pénétrer dans les cellules encore intactes, libérant de nouveaux virions après le deuxième cycle, etc... Ainsi, après plusieurs cycles, toutes les cellules seront décollées du fond de la cupule. On pourrait admettre qu'un seul virion est capable de donner ce même résultat.

Pour le titrage, nous utilisons une plaque de microtitration et le mode opératoire décrit plus loin (cf page 48).

Une série de 10 dilutions, décroissantes par puissance de 10, est réalisée dans des tubes à hémolyse. Chaque dilution est introduite, à raison de 0,1 ml par cupule, dans les 8 alvéoles d'une même colonne de la plaque.

Au bout de quelques jours, la lecture des fonds des alvéoles donnera par exemple les résultats suivants :

de 10^{-1} à 10^{-5} : toutes les cellules sont détruites

à 10^{-6} : seulement 4 alvéoles sur 8 ont des cellules mortes

de 10^{-7} à 10^{-10} : toutes les cellules sont intactes.

La dilution 10^{-6} est donc celle qui correspond à la concentration du virus en dose infectante à 50 % par ml (DI 50/ml). Ceci signifie qu'à cette dilution, nous considérons que 4 cupules au plus ont reçu au moins une particule infectante, les 4 autres n'ayant pas été infectées.

Le titre de la suspension est donc, d'après l'exemple choisi, de 10^7 DI 50/ml (puisque l'on avait inoculé 0,1 ml par cupule).

4-3 - Choix des dilutions à utiliser pour les tests

L'étude systématique de l'activité antivirale de toutes les espèces de champignons citées au sous-chapitre A a été réalisée en utilisant parallèlement trois dilutions différentes de Coxsackie B₁ :

- une concentration faible, correspondant à la DI 50/ml
- une concentration moyenne, correspondant à 10 DI 50/ml
- une concentration forte, égale à 100 DI 50/ml.

5 - METHODES DE CRIBLAGE

Le principe de la recherche d'une activité antivirale est de comparer l'état des cultures cellulaires lorsqu'elles sont mises en contact avec le virus d'une part, le champignon et le virus d'autre part. Si le liquide testé possède une quelconque activité virostatique ou virulicide, la couche "monocellulaire" sera encore bien accrochée à la paroi de la cupule alors que celle correspondant à l'inoculation du virus seul aura totalement disparu.

5-1 - Matériel utilisé

Nos essais ont tout d'abord été réalisés sur plaques de VINAN^x, préalablement découpées pour être introduites dans de grandes boîtes de Petri (diamètre intérieur = 14 cm), l'ensemble étant stérilisé à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C.

La suspension cellulaire est répartie dans chaque cupule, puis le liquide de culture du champignon à tester est introduit, ainsi que les dilutions virales choisies. L'ensemble est placé dans une étuve bactériologique à 37°C et l'examen du fond des cupules est effectué 48 heures plus tard. Cette technique a cependant de nombreux inconvénients, en particulier un nombre de cupules insuffisant -ce qui multiplie celui des plaques et des boîtes à stériliser-, une difficulté à garder la stérilité lors de l'introduction des différentes fractions du test, une lecture délicate à travers la boîte, etc...

Nous avons donc abandonné cette méthode au profit d'une autre qui nécessite beaucoup moins de manipulations et de stérilisations préa-

^xPlaques de VINAN pour bouillons de culture, aux Etablissements NICOLLE 94 GENTILLY (FRANCE).

tables : la plaque de microtitration^{*}, spécialement conçue pour cultures de cellules.

Cette plaque (96 x 127 cm) contient 96 cupules disposées sur 8 lignes (lettrées de A à H) et 12 colonnes (numérotées de 1 à 12). Chaque cupule (de diamètre 7 mm) possède un fond plat d'une surface de 0,38 cm²; sa capacité est de 0,4 ml. Elle est livrée stérile, (malheureusement pas en emballage unique) avec un couvercle stérile emballé séparément. Afin d'assurer une fermeture la plus hermétique possible, une feuille d'acétate à face adhésive^{**} est déposée directement sur les alvéoles.

5-2 - Mode opératoire

La recherche systématique proprement dite se fera toujours suivant le même schéma, en emplissant les 96 cupules de la plaque de microtitration de la façon suivante :

Chaque cupule reçoit, à la pipette Pasteur, V gouttes de suspension cellulaire, ce qui représente environ 50 000 cellules KB. Une fois l'opération terminée, la plaque est mise à l'étuve à 37°C pendant une heure, de manière à ce que les cellules se déposent au fond des alvéoles et puissent commencer leur cycle de multiplication.

Les cupules reçoivent ensuite les substances à étudier.

*Plaque de microtitration DISPOSO-TRAYS. Réf.: IS-FB-96-TC, vendue en France par POLYLABO (STRASBOURG-MEINAU).

**Feuille adhésive DISPOSO-TRAYS. Réf.: 18006 (même provenance)

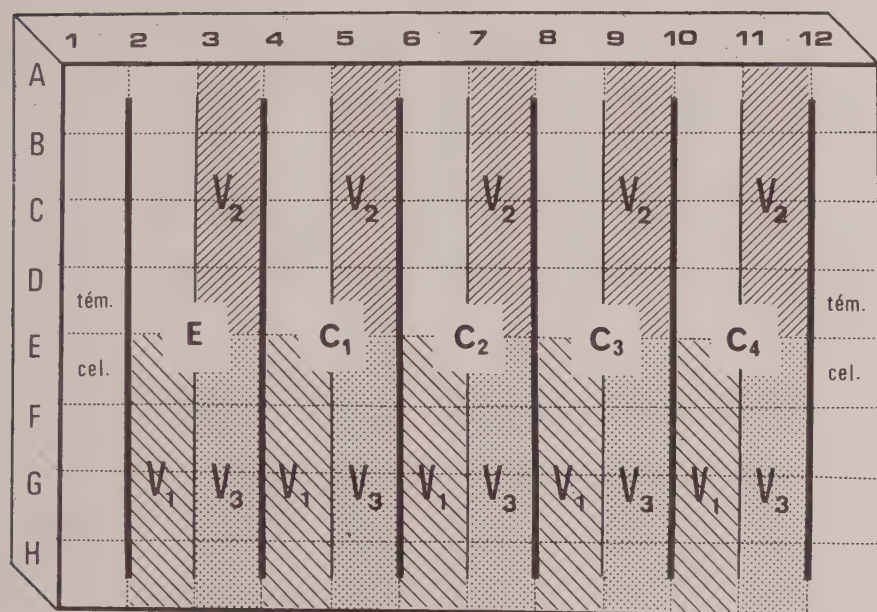


Schéma d'utilisation des alvéoles
d'une plaque de microtitration

Quatre liquides de culture de champignons (que nous conviendrons de désigner par C_1 , C_2 , C_3 et C_4) sont introduits, à raison de 1 goutte par alvéole :

- dans les colonnes 4 et 5 : C_1
- " 6 et 7 : C_2
- " 8 et 9 : C_3
- " 10 et 11 : C_4 .

De plus, les trois dilutions virales utilisées, symbolisées par :

- concentration forte : V_1 (100 DI 50/ml)
- concentration moyenne: V_2 (10 DI 50/ml)
- concentration faible : V_3 (DI 50/ml)

sont ajoutées à raison de 1 goutte par alvéole, dans :

- les 4 cupules inférieures (E, F, G, H) des colonnes $2n$,
pour la dilution V_1
- les 4 cupules supérieures (A, B, C, D) des colonnes $2n + 1$
pour la dilution V_2
- les 4 cupules inférieures (E, F, G, H) des colonnes $2n + 1$
pour la dilution V_3

(n variant de 1 à 5).

Enfin nous ajoutons, pour conserver les mêmes concentrations relatives des différentes fractions du test :

- une goutte de milieu de HANKS dans toutes les cupules qui n'ont pas reçu de virus (même les colonnes 1 et 12),
- une goutte d'eau physiologique stérile dans toutes les cupules qui n'ont pas reçu de liquide de culture de champignon (même les colonnes 1 et 12).

Après avoir agité soigneusement la plaque, nous obturons les alvéoles à l'aide de la feuille adhésive, sur laquelle le couvercle est placé, mentionnant les différentes opérations réalisées, ainsi que le jour et l'heure de l'expérience. Elle est portée à l'étuve bactériologique à 37°C.

CHAPITRE II

RESULTATS

La lecture se fait après 48 heures. La plaque est retournée et le fond des alvéoles est observé soit à la loupe au fort grossissement (x 50), soit au microscope au faible grossissement (x 100).

1 - EXAMEN DES PLAQUES

1-1 - Aspect des colonnes 1 et 12

Les alvéoles correspondants contiennent les cellules KB, une goutte d'eau physiologique et une goutte de solution de HANKS. Les tapis cellulaires sont toujours constitués de belles cellules confluentes. Ils nous servent de témoins-cellules.

1-2 - Aspect des colonnes 2 et 3

Les cupules correspondantes ne contiennent que des cellules et le virus, mais pas de liquide à tester. Elles nous servent de témoins-virus.

- les alvéoles A,B,C,D de la colonne 2 ne sont pas utilisés,
- les alvéoles E,F,G,H de la colonne 2 donnent l'aspect des cellules infectées par la concentration virale forte V_1 ; tout est décollé, le fond des 4 cupules est entièrement libre;
- les alvéoles A,B,C,D de la colonne 3 contiennent les cellules et le virus à la concentration V_2 ; aucune cellule n'a survécu. Seules quelques cellules sombres, rabougries, comme flétries, restent encore accrochées à la paroi;
- les alvéoles E,F,G,H de la colonne 3 offrent un aspect différent : une cupule -deux au plus- ou quelquefois aucune- ressemble à celles des cellules-témoins; les autres présen-

tent des parois à demi-recouvertes d'îlots de quelques cellules encore confluentes. Une lecture plus tardive indiquerait évidemment une mortalité totale, mais la comparaison, à ce stade, avec les témoins cellulaires donne cependant un résultat significatif.

1-3 - Aspect des autres colonnes

Une même espèce de champignon est donc testée dans 2 colonnes consécutives d'une même plaque : les colonnes $2n$ et $2n + 1$
(n variant de 2 à 5)

1-3-1 - Les quatre premières cupules (A, B, C, D) de la colonne $2n$ ne comportent en effet que les cellules et le liquide de culture du champignon. L'examen du fond de ces alvéoles donne donc une idée de la cytotoxicité de l'espèce étudiée. La plupart des souches testées ont été trouvées non cytotoxiques. Les noms des champignons à effet cytopathique sont inscrits au paragraphe 2-2.

1-3-2 - Les cupules E, F, G, H de la colonne $2n$ et toutes celles de la colonne $2n + 1$ sont, en général, identiques aux alvéoles correspondants des témoins-virus.

Seules 9 espèces donnent le résultat suivant :

- à forte concentration virale (V_1), le tapis cellulaire peut, au bout de 48 heures, soit être complet, soit posséder plus de 50 % de cellules vivantes;
- à dilution moyenne (V_2), les cellules sont en couche "monocellulaire", toutes confluentes, et emplissent la totalité de la surface de l'alvéole;
- à la DI 50/ml (V_3), même aspect qu'en V_2 .

Nous considérons donc que ces 9 espèces fongiques ont une activité anti-Coxsackie B_1 .

2 - RESULTATS

Afin d'éviter de présenter les résultats sous forme de tableau étant donné le petit nombre d'espèces étudiées trouvées actives, il nous a semblé utile de dresser les listes des champignons appartenant à l'une des trois catégories suivantes :

- espèces non cytotoxiques et inactives vis-à-vis du virus utilisé
- espèces cytotoxiques vis-à-vis des cellules KB
- espèces non cytotoxiques et à activité anticoxsackie B₁.

2-1 - Espèces non cytotoxiques vis-à-vis des cellules KB et inactives vis-à-vis du Cocksackie virus B₁

- 1189 *Phyllotopsis nidulans*
- 2003 *Pleurotus ostreatus*
- 1190 " *salignus*
- 2004 *Panus suavisissimus*
- 237 *Lentinus variabilis*
- 1149 *Hygrophorus eburneus*
- 1028 *Lyophyllum infumatum*
- 1170 " *aggregatum*
- 2005 *Calocybe constricta*
- 713 " "
- 1281 " *leucocephala*
- K 132 " *georgii*
- 1154 *Laccaria laccata*
- 1248 *Clitocybe gilva*
- 605 " *diatreta*

	1284	<i>Clitocybe</i>	<i>pityophila</i>
K 72		"	"
	749	"	<i>cf cerussata</i>
K 69		"	<i>gibba</i>
	1010	"	<i>nebularis</i>
	747	"	"
	1020	"	<i>decembris</i>
	1052	"	"
	835	"	<i>splendens</i>
	744	"	<i>dealbata</i>
	969	"	"
	292	"	<i>litua</i>
	113	"	<i>hydrogramma</i>
	391	"	<i>lignatilis</i>
K 94		"	<i>sp.</i>
	1280	"	<i>olearius</i>
	1249	"	"
	128	<i>Lepista</i>	<i>sordida</i>
	1069	"	<i>nuda</i>
	998	"	<i>luscina</i>
K 95		"	"
	1202	"	<i>personata</i>
	168	<i>Tricholomopsis</i>	<i>platyphylla</i>
	141	<i>Tricholoma</i>	<i>trigonosporum</i>
	1198	"	<i>irinum</i>
	901	"	<i>vaccinum</i>
	891	"	<i>album</i>
	1278	"	"
	898	"	<i>orirubens</i>
	1072	"	<i>albobrunneum</i>
	1003	"	<i>equestre</i>
	958	"	<i>cingulatum</i>
	1205	"	<i>acerbum</i>
	1209	"	<i>scalpturatum</i>

- K 147 *Resupinatus unguicularis*
1011 *Melanoleuca graminicola*
847 " "
1176 " *melaleuca*
K 152 *Armillaria fusipes*
355 *Collybia butyracea*
972 " "
973 " *distorta*
K 82 " "
750 " *dryophila*
1273 " "
94 " *confluens*
2009 " "
656 " *peronata*
933 " "
935 " "
993 " "
259 *Panellus serotinus*
1274 *Oudemansiella radicata*
1109 ' *longipes*
607 *Pseudohiatula conigenoides*
1175 *Marasmius perforans*
840 " *Buxi*
1047 " *oreades*
153 " *alliaceus*
240 " *inodorus*
241 " *rotula*
934 " *ramealis*
96 " *globularis*
2008 " *prasiosmus*
1262 " *bresadolae*
1277 " "
1173 " *dryophilus*
1119 *Crinipellis stipitarius*
103 *Mycena pura*
994 " *fagetorum*

- 1178 *Mycena galopoda*
1177 " *epipterygia*
937 " *epipterygioides*
1183 " *rorida*
245 " *elegans*
539 " *alcalina*
382 " *sanguinolenta*
102 " *inclinata*
1181 " *polygramma*
1008 *Xeromphalina caulicinalis*
249 " *campanella*
1049 *Amanita muscaria*
L 14 " *eliae*
1041 *Pluteus curtisii*
1026 *Macrolepiota procera*
1276 " *rhacodes*
85 *Leucoagaricus exscoriatus*
672 *Agaricus xanthodermus*
1266 " *bisporus*
1192 " *augustus*
1030 " *campestris*
1068 " *silvicola*
2006 " *silvaticus*
1040 *Lepiota micropholis*
K 79 " *sp.*
869 *Phaeolepiota aurea*
612 *Coprinus lagopus*
2001 " *comatus*
1275 " *atramentarius*
621 *Psathyrella hydrophila*
622 " *gracilis*
279 " *sarcocephala*
126 " *pennata*
1042 " *sp.*

557	<i>Panaeolus</i>	<i>papilionaceus</i>
871	<i>Agrocybe</i>	<i>aegerita</i>
999	<i>Stropharia</i>	<i>aeruginosa</i>
1265	"	"
634	"	<i>semiglobata</i>
1139	"	<i>coronilla</i>
493	<i>Naematoloma</i>	<i>capnoides</i>
2002	"	"
1132	<i>Pholiota</i>	<i>squarrosa</i>
872	"	<i>aurivella</i>
59	"	<i>spumosa</i>
1130	"	<i>lucifera</i>
793	"	<i>graminis</i>
481	"	<i>albocrenulata</i>
1131	<i>Kuehneromyces</i>	<i>mutabilis</i>
802	<i>Hebeloma</i>	<i>edurum</i>
804	"	<i>sinapizans</i>
2007	"	<i>spoliatum</i>
1144	"	<i>crustuliniforme</i>
794	<i>Phaeomarasma</i>	<i>limulatus</i>
1283	<i>Cortinarius</i>	<i>rufo-olivaceus</i>
1254	"	<i>praestans</i>
1143	<i>Gymnopilus</i>	<i>hybridus</i>
800	"	<i>picreus</i>
797	<i>Galerina</i>	<i>mycenopsis</i>
946	"	<i>marginata</i>
1134	"	"
980	"	"
K 92	"	<i>mniochila</i>
2	"	<i>paludosa</i>
1118	<i>Crepidotus</i>	<i>variabilis</i>
786	"	<i>applanatus</i>

415 *Clitopilus pinsitus*
1272 " *prunulus*
1012 *Rhodophyllus mammosus*
883 " *nitidus*
740 " *byssisedus*
949 " *cetratus*
20 *Hygrophoropsis aurantiaca*
1188 *Paxillus involutus*
1285 " *panuoides*
1141 *Gomphidius glutinosus*
1287 *Suillus grevillei*
12 " *granulatus*
1268 *Lactarius hepaticus*
1261 " *torminosus*
1260 " *controversus*

B 5291 *Podoscypha nuda*
B 6035 " *involuta*
B 5444 *Scytinostroma luteolum*
B 6472 " *portentosum*
B 4076 *Coniophora arida*
B 2443 *Hericium coralloides*
B 5559 *Gloeodontia discolor*
B 6031 *Punctularia tuberculosa*
B 673 *Stereum gausapatum*
B 3915 " *ostrea*
B 111 *Amylostereum chailletii*
B 4905 " *laevigatum*
B 4421 *Xylobolus subpileatus*

- B 6551 *Veluticeps Berkeleyi*
B 737 *Peniophora incarnata*
B 3203 " *pini*
B 4198 " *nuda*
B 4439 " *violaceo-livida*
B 3829 *Phanerochaete velutina*
B 4332 *Aleurocystidiellum subcruentatum*
B 3306 *Leucogyrophana mollusca*
B 4668 *Metulodontia roumegueri*
B 5284 *Gloeocystidiellum flammeum*
B 6552 "*Odontia*" *nothofagi*
B 6576 *Merulius aureus*
B 6708 *Steccherinum rhois*
B 5745 *Donkia pulcherrima*

2-2 Espèces à effet cytotoxique

Les liquides de culture mycélienne dont les noms suivent présentent, au contact d'une suspension homogène de cellules KB, une activité cytotoxique importante, car ces liquides bruts stériles détruisent l'ensemble du tapis cellulaire en 48 heures au plus.

- 670 *Pleurotus eryngii*
- 283 *Schizophyllum commune*
- 748 *Clitocybe odora*
- K 70 " *gibba*
- 971 " *suaveolens*
- 1102 " *rivulosa*
- 400 *Lepista nuda*
- 1074 *Tricholoma ustaloides*
- 244 *Mycena crocata*
- 1044 *Agaricus xanthodermus*
- 162 *Agrocybe dura*
- 55 *Pholiota alnicola*
- K 86 *Hebeloma radicosum*
- B 6665 *Scytinostroma galactinum*

A cette liste de 14 espèces, nous devons ajouter les noms de 4 champignons qui, au contact des cellules KB, révèlent une toxicité beaucoup moins importante, mais détruisent cependant près de la moitié du tapis "monocellulaire" au bout de 48 heures. Il s'agit de :

- K 117 *Clitocybe inornata*
- 647 *Lentinellus bisus*
- 365 *Naematoloma fasciculare*
- 257 *Gymnopilus spectabilis*

2-3 - Espèces non cytotoxiques et à activité anti-

Coxsackie B₁

- 967 *Clitocybe candicans*
- 1024 *Hohenbuehelia geogenius*
- 968 *Pseudoclitocybe cyathiformis*
- K 93 *Mycena rosella*
- 855 " *galopoda*
- 849 " *aetites*
- 246 " *flavoalba*
- 544 " *iodiolens*
- 834 *Macrolepiota procera*

3 - INTERPRETATION DES RESULTATS - DISCUSSION

3-1 - Espèces cytotoxiques

Nous avons été tout d'abord surpris du nombre peu élevé d'espèces ayant une influence néfaste sur les cultures cellulaires. En effet, 18 espèces seulement ont fait preuve d'une cytopathogénicité telle que le tapis cellulaire a été détruit. Les fonds des alvéoles correspondants sont en effet absolument vides : toutes les cellules sont décollées.

Il serait évidemment très intéressant d'étudier ces espèces d'une façon plus approfondie, en utilisant différentes dilutions des liquides de culture de champignons, et en les testant sur d'autres cellules que les souches KB ou les souches HeLa.

Nous remarquons enfin que l'espèce :

K 70 *Clitocybe gibba*, récoltée et bouturée par R. KÜHNER en 1960, se montre très cytopathique alors que la même espèce :

K 69 *Clitocybe gibba*, provenant d'une souche récoltée et bouturée par la même personne le 13 avril 1954, s'est révélée absolument non toxique vis-à-vis des mêmes cellules.

Nous pourrions également faire la même constatation pour :

1044 *Agaricus xanthodermus*, souche récoltée à MENS (Isère) en juillet 1960 : cytotoxique
et 672 *Agaricus xanthodermus*, souche provenant de l'exposition de la Société Linnéenne de Lyon du 18 octobre 1953 :
non toxique.

Nous retrouvons encore cette constatation déjà décrite par L. ODDOUX (1960) quant à l'origine des souches. La notion d'espèce est, dans le cas des recherches antivirales comme dans celui des tests antibactériens ou antifongiques, d'une importance toute relative; elle doit, de toutes façons, être obligatoirement complétée par la connaissance du lieu et de la date de la récolte, qui caractérise une souche.

En effet L. ODDOUX a testé 2 souches différentes de *Marasmius confluens*: la première, obtenue en 1950, a montré une forte activité antibiotique vis-à-vis de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* et d'*Escherichia coli*, tandis que la seconde, provenant d'un carpophore récolté 5 années plus tard dans la même région (SAMOËNS, Haute-Savoie), n'a aucun effet inhibiteur sur le développement de ces bactéries.

La notion d'espèce tendrait ainsi à laisser la place à celle de race biologique d'un champignon. Il n'est à ce jour certainement pas possible d'expliquer cette différence de propriétés entre deux souches d'une même espèce :

peut-être les variations biologiques des substances du sol, dont la composition chimique est souvent fonction des saisons ou même des différences de climat de deux automnes consécutifs, sont-elles à l'origine de cette constatation,

peut-être aussi l'existence d'un pore sur le septum séparant deux articles voisins d'une hyphe est-elle responsable d'une variabilité incontrôlable du matériel génétique du thalle végétatif, car ce pore, plus ou moins obturé suivant les conditions extérieures par le corps de WORONIN (actuellement mis en évidence grâce à la microscopie électronique), permet un échange permanent entre les cellules grâce aux courants cytoplasmiques qui entraînent, avec le hyaloplasme, une partie du matériel nucléaire.

De toutes façons, il conviendrait d'étudier ces espèces toxiques pour les cellules néoplasiques en culture sur d'autres souches de cellules non cancéreuses (rein de singe par ex.), ainsi que de tester les liquides de culture sur des animaux cancérisés. H. BERIEL (1970) démontre d'ailleurs que, parmi nos espèces cytotoxiques, 162 *Agrocybe dura* est douée d'une activité antitumorale *in vitro*, mise en évidence par la survie des souris inoculées par un mélange de liquide de culture mycélienne et de liquide d'ascite du sarcome d'Ehrlich.

3-2 - Espèces à activité anti-Coxsackie B₁

Le nombre des champignons trouvés actifs n'est pas non plus très important. Cependant nous avons été frappé par le fait que, sur les 9 espèces retenues, 5 appartiennent au genre *Mycena*.

En effet, alors que sur 19 espèces différentes de *Clitocybe*, seul 967 *Clitocybe candicans* possède une activité antivirale *in vitro*, et qu'aucun champignon parmi les 12 *Tricholoma*, les 11 *Marasmius*, les 7 *Pholiota* étudiés, ne révèle la moindre activité, nous avons trouvé 5 espèces actives différentes appartenant au genre *Mycena* parmi les 16 testées.

Il y aurait peut-être ici sujet à recherche plus approfondie sur les métabolites des espèces de *Mycena* élaborées en culture pure. Il est en effet impossible de mettre en relation la notion du genre et celle d'une activité antibiotique quelconque. Nous avons déjà remarqué au paragraphe précédent qu'il ne s'agit même pas de la notion d'espèce, mais de celle de race du champignon.

Une nouvelle preuve nous en est donnée encore :

855 *Mycena galopoda*

récoltée à SAMCÈNS (Grand Crêt, Haute Savoie) en septembre 1955 possède une activité anti-Coxsackie B très importante, alors que la même espèce :

1178 *Mycena galopoda*

provenant de St APOLLINAIRE (Loire)

n'a aucune action qui puisse sauver les cellules inoculées par le virus bien que le bouturage en soit plus récent (novembre 1961).

En conclusion, la méthode que nous venons de décrire pour le test antiviral des différentes espèces de champignons, possède de nombreux avantages :

- elle est rapide; nous avons pu en effet expérimenter 4 souches différentes sur une même plaque de microtitration;
- la lecture s'effectue après 48 heures d'incubation à 37°C, ce qui est très appréciable; de plus cette lecture est facile et nous dispense de réaliser des numérations cellulaires; en général, il n'y a que 2 réponses possibles : le tapis cellulaire est encore accroché, ou n'existe plus;
- elle ne nécessite aucun support vivant animal;
- elle permet une expérimentation à tous les instants, à condition bien sûr de posséder suffisamment de cellules en lignée continue.

C'est en effet ce dernier point qui donne à la méthode son inconvénient majeur : la nécessité d'être en possession constante de cellules en quantité suffisante et en temps voulu, avec des repiquages très fréquents et des changements de milieu presque journaliers.

De plus, les cellules sont relativement fragiles et il nous est arrivé souvent de contaminer des cultures sans en pouvoir parfois déterminer la cause.

Si cette méthode de criblage permet la recherche *in vitro* d'une activité antivirale dans les liquides de culture fongique, elle ne tient pas compte du devenir de ces substances quand elles sont inoculées à un être vivant; aussi avons-nous voulu vérifier nos résultats en expérimentant les neuf espèces trouvées antivirales, sur un animal de laboratoire.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE *IN VIVO* DES MYCELIUMS
ACTIFS *IN VITRO* SUR LES COXSACKIEVIRUS B₁

C H A P I T R E I

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL D'ETUDE

1 - CHOIX DE L'ANIMAL

Ce choix est évidemment fonction de la sensibilité de l'animal au virus étudié. Dans le cas des virus Cocksackie, nous avons été obligé de travailler sur des souriceaux nouveau-nés, seul animal de laboratoire pour lequel le Cocksackievirus B est pathogène. Bien entendu, la nécessité d'avoir des souriceaux âgés de un jour nous a conduit à organiser un élevage avec accouplements prévus, suivant un calendrier précis, de manière à posséder toujours un matériel d'expérimentation en nombre suffisant et en temps voulu.

Nous avons utilisé des cages de petite dimension (22 x 14 x 12cm) en matière plastique translucide (permettant ainsi une désinfection et un nettoyage sans difficulté) sur lesquelles est plaquée une grille retenant la nourriture et le biberon. En vue d'un accouplement, un mâle est placé avec 4 femelles, ces dernières seront placées ensuite individuellement dans une cage après 18 à 20 jours, c'est-à-dire 3 à 5 jours avant la mise-bas.

Dès la mise-bas (ce qui signifie qu'il faut observer chaque femelle porteuse 2 à 3 fois par jour), nous relevons la date et l'heure approximative de la naissance, ainsi que le nombre de nouveau-nés.

Nous préférons toujours des souriceaux provenant de mères multipares, car nous avons quelquefois constaté que certaines primipares sont de "mauvaises mères" ou sont dotées d'un cannibalisme important; ces dernières sont sacrifiées, tandis que les autres sont conservées.

2 - PREPARATION DES LIQUIDES DE CULTURE DE CHAMPIGNONS TROUVES ACTIFS LORS DU CRIBLAGE SUR CELLULES

La culture en erlenmeyers agités, la filtration, la neutralisation à pH 7 et la stérilisation des liquides de culture des champignons à étudier se réalisent de la même manière que précédemment (voir page 33).

Les espèces suivantes sont ainsi préparées :

- 967 *Clitocybe candicans*
- 1024 *Hohenbuehelia geogenius*
- 968 *Pseudoclitocybe cyathiformis*
- K 93 *Mycena rosella*
- 855 " *galopoda*
- 849 " *aetites*
- 246 " *flavoalba*
- 544 " *iodiolens*
- 834 *Macrolepiota procera*

Après la filtration stérilisante (Sweenex 0,2 μ) les liquides de culture à étudier sont répartis dans des tubes à hémolyse, et conservés à -70°C. Ils seront décongelés au moment de l'expérience.

B - METHODES UTILISEES

1 - CHOIX DE LA METHODE D'INOCULATION DE LA SOUCHE VIRALE A L'ANIMAL

Il existe différentes manières d'inoculer le virus Cocksackie B à des souriceaux nouveau-nés. Les trois voies classiques d'introduction ont été essayées, mais en tout état de cause, toujours sur des nouveau-nés de moins de 24 heures, car il semble que la sensibilité au Cocksackie B₁ décroît quand l'âge du souriceau augmente.

La préhension des animaux se fera soit avec des pinces à mors plat, soit avec la main gauche de l'opérateur, main munie d'un gant de type chirurgical.

1-1 - Voie sous-cutanée

C'est la méthode d'inoculation la plus simple. La quantité de suspension virale introduite est de 0,1 à 0,2 ml. Le point d'inoculation se trouve en dessous de la région interscapulaire.

1-2 - Voie intra-péritonéale

Il s'agit également d'une méthode facile. La quantité à injecter est évidemment plus faible (0,05 à 0,1 ml).

Cette voie, ainsi que la précédente, possèdent l'avantage de la précision de la quantité à introduire, contrairement peut-être à la troisième voie.

1-3 - Voie intra-crânienne

Deux possibilités s'offrent à nous pour l'injection intra-crânienne :

- ou bien nous déposons, à la seringue, une goutte de suspension virale sur la fontanelle du souriceau, puis nous piquons avec l'aiguille au milieu de la goutte. Nous fixons solidement la tête pour que la goutte ne tombe pas : il en pénètre ainsi une quantité variable, non mesurable, mais toujours suffisante;
- ou bien nous pénétrons avec l'aiguille dans la zone lombaire, comme pour une injection sous-cutanée, nous remontons selon une ligne paravertébrale jusqu'à buter contre la boîte crânienne. Nous retirons très légèrement l'aiguille et lui donnons une incidence oblique pour contourner l'occiput. Enfin nous relevons la pointe de l'aiguille pour pénétrer dans l'encéphale et injectons la quantité désirée (0,02 à 0,03 ml).

Cette dernière méthode est certes plus précise quant à la dose inoculée, mais demande une grosse habitude pour ne pas traumatiser l'animal. C'est cette voie cependant que nous avons préférée et adoptée pour toute notre expérimentation, en raison de l'inoculation in situ de l'agent pathogène.

Quelle que soit la méthode utilisée, nous observons les souriceaux 2 fois par jour. Les morts relevées dans les premières

cependant certains facteurs sont restés constants tout au long de l'expérimentation :

- la voie d'introduction :
 - de l'espèce fongique : 2 inoculations par animal,
une par voie sous-cutanée,
l'autre par voie intra-péritonéale,
 - de l'inoculum viral : 1 seule inoculation,
par voie intra-crânienne;
- la quantité injectée :
 - 0,2 ml en sous-cutanée
 - 0,1 ml en intra-péritonéale
 - 0,02 à 0,03 ml en intra-crânienne;
- le pH des différents liquides de culture égal à 7;
- le lot d'animaux constitué d'une mère venant de mettre bas et de 8 à 12 nouveau-nés appartenant, lorsque cela était possible, à deux portées différentes;
- chaque expérience répétée deux fois, voire trois fois dans les cas de lecture douteuse ou de cannibalisme trop important des mères. Il est en effet difficile de savoir si un souriceau disparu pendant une nuit a été mangé alors qu'il était déjà mort ou au contraire mangé par une "mauvaise mère".

Nous constituons, pour chacun des 9 liquides de culture, différents lots d'animaux sur lesquels les opérations suivantes sont effectuées :

- 1er lot : souriceaux témoins recevant une injection d'eau physiologique (voies sous-cutanée et intra-péritonéale),
lot que nous convenons de désigner par "Témoin-eau"
- 2ème lot: souriceaux recevant le liquide de culture du champignon :
lot "Champignon"
- 3ème lot: souriceaux recevant la suspension virale à la dilution de 100 DL 50 :
lot "Témoin-virus"
- 4ème lot: animaux recevant 3 injections (voies sous-cutanée, intra-péritonéale et intra-crânienne) du mélange constitué par la suspension virale et le liquide fongique, placé préalablement en incubation pendant 1 heure à la température du laboratoire :
lot "Virus + Champignon"
- 5ème lot: animaux recevant le virus, remis en cage pendant 2 heures, puis repris pour l'inoculation du liquide fongique :
lot "Virus—Champignon"
- 6ème lot: souriceaux recevant le champignon, remis en cage pendant 2 heures, puis repris pour l'inoculation de la suspension virale :
lot "Champignon—Virus".

Il nous a rarement été possible de réaliser le même jour les six expériences sur une même espèce fongique. En effet le nombre des nouveau-nés disponibles tel jour est loin d'être constant du fait de la très inégale durée des gestations et du nombre variable des souriceaux à chaque mise-bas. Les deux premiers lots("Témoin-eau" et "Champignon") ont d'ailleurs le plus souvent été effectués indépendamment des autres. Lorsque les lots nécessitant une inoculation virale ont été réalisés à plusieurs jours de distance, un nouveau "Témoin-virus" a été pratiqué.

vingt quatre heures -souvent dues au traumatisme de l'inoculation- ne sont pas comptabilisées.

2 - SIGNES CLINIQUES DUS A L'INFECTION PAR LES COXSACKIE-VIRUS B

En général, les dix animaux du même lot présentent au bout de 3 à 4 jours les symptômes caractéristiques de l'infection à Cossackie B : des secousses spastiques des quatre membres -signe clinique facilement visible lorsqu'on maintient le souriceau couché sur le dos-, ainsi qu'une déshydratation plus ou moins importante, accompagnée de cyanose. Un état de dénutrition apparaît alors, facilement mis en évidence par l'absence de lait dans l'estomac visible à travers la paroi épigastrique de l'animal. La mort intervient au plus tard 12 heures après ces symptômes.

3 - PREPARATION DE L'INOCULUM INFECTIEUX

La suspension virale qui nous a servi lors de notre recherche systématique *in vitro* est inoculée non diluée aux souriceaux nouveau-nés par voie intra-crânienne. Cette suspension ne provoque pas, lors du premier passage, une mortalité très forte car le virus semble adapté aux cellules en lignée continue. Cependant, dès les premiers signes cliniques, les animaux sont tués à l'éther, écorchés et éviscérés après qu'aient été coupées la queue et les extrémités des quatre pattes. La boîte crânienne et l'encéphale sont conservées en raison du neurotropisme important des virus du groupe B. Les carcasses contenant les muscles, l'encéphale et la graisse brune interscapulaire, sont alors placées dans une boîte de Petri stérile, et congelées.

Elles sont ensuite écrasées dans un mortier préalablement stérilisé et refroidi au congélateur. Cette opération doit être faite le plus aseptiquement possible, sous une hotte stérile, en prenant soin de manipuler avec des gants. Les souriceaux sont ainsi écrasés avec le pilon froid contre la paroi du mortier jusqu'à obtenir une "pâte" homogène qui décongèle petit à petit au fur et à mesure de la manipulation. Nous ajoutons ensuite de la solution de HANKS à raison de 10 ml par souriceau. La suspension est alors centrifugée à froid, à une vitesse faible (environ 1000 tours/minute^{*}) pour sédimenter les débris d'os et les grosses particules. Le surnageant est récupéré, additionné d'antibiotiques (1000 U.I. de Pénicilline et 10 mg de Streptomycine) et inoculé à un nouveau lot de souriceaux pour un deuxième passage. Nous pourrions ainsi réaliser une nouvelle suspension virale avec le même procédé décrit plus haut. Cette dernière sera diluée ensuite par puissances de 10, jusqu'à obtenir une suspension donnant un taux de mortalité de 50 % au bout de 3 jours (DL 50).

Dans toutes nos expérimentations, l'inoculum infectieux utilisé est une dilution correspondant à 100 DL 50. Il est réparti dans des tubes à hémolyse stériles et stocké à la température de -70°C.

4 - ESSAIS DES LIQUIDES DE CULTURE FONGIQUE

Nous avons étudié les 9 liquides de culture trouvés actifs *in vitro* sur le virus Cocksackie en utilisant différentes méthodes quant à l'inoculation -simultanée ou non- du champignon et du virus;

* Centrifugeuse réfrigérée de laboratoire. Réf. : K 23 JANETZKI représenté en France par P. BLOCK & Cie STRASBOURG MEINAU.

Les souriceaux sont surveillés avec la plus grande attention; les morts sont immédiatement retirés de la cage et placés dans un bain de soluté de formaldéhyde dilué. Pour chaque lot, les survivants éventuels et la mère sont sacrifiés, en général au bout de 3 semaines, par inhalation d'éther suivie de trempage dans le formaldéhyde. Toutes les manipulations se font à la pince en prenant toutes les précautions nécessaires à la protection de l'expérimentateur.

Pendant les deux semaines d'observation, il est noté 2 fois par jour :

- le nombre de souriceaux survivants,
- leur aspect (cyanose, présence ou absence de lait dans l'estomac),
- leur mobilité ou leur paralysie, l'apparition des premières secousses.

CHAPITRE II

RESULTATS

1 - RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Nous présentons les résultats obtenus pour une même espèce fongique sous forme d'un tableau récapitulatif indiquant le nombre de souriceaux morts ou disparus en fonction d'une part du mode d'inoculation employé et d'autre part du temps exprimé en jours.

L'interprétation des résultats d'un même champignon est inscrite sur la page en regard du tableau correspondant.

Nous avons été parfois contraint, par manque momentané de souriceaux nouveau-nés, dû aux difficultés de l'élevage, de ne pas réaliser de "Témoin-eau" pour quelques unes des espèces fongiques étudiées; nous pensons que cette absence de témoin à peu d'importance, étant donné l'innocuité de tous les liquides de culture inoculés.

TABLEAU I - Etude *in vivo* de l'activité anticoagulant B de 967 *Clitocybe candicans* (Pers.ex Fr.) Kummer

Lot	Jour							Observations
	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	
Témoin-eau (lot de 9 souris)	0	0	0	0	0	0	0	
Champignon (lot de 9 souris)	0	0	0	0	0	0	0	sacrifiés le 13e jour
Témoin-virus (lot de 6 souris)	1	1	4	-	-	-	-	
Virus + Champignon (Lot de 12 souris)	0	0	8	4	-	-	-	
Virus — Champignon (lot de 11 souris)	0	5	5	1	-	-	-	
Champignon — Virus (Lot de 11 souris)	2	0	1	4	4	-	-	

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement

Interprétation des résultats du Tableau I

Nous remarquons immédiatement que le liquide de culture mycélienne ne possède aucune activité toxique pour l'animal. Les souriceaux prennent du poids et se comportent d'une façon identique aux témoins traités par l'eau physiologique. Ils sont sacrifiés le 13ème jour.

Les nouveau-nés inoculés uniquement avec le virus sont tous morts au matin du 3ème jour. Certains d'entre eux ont d'ailleurs été mangés par la mère, et nous trouvons dans la cage des queues et des boîtes crâniennes.

L'inoculation du mélange extemporané suspension virale-liquide fongique ne permet pas une amélioration notable de l'état des animaux, les deux tiers des souriceaux meurent au troisième jour, le tiers restant, le lendemain.

L'injection du champignon, effectuée 2 heures après l'infection virale, ne donne non seulement aucune amélioration mais au contraire une aggravation de l'état général; dès le deuxième jour, la moitié des animaux meurent; tout se passe comme si le liquide de *Clitocybe candicans* agissait comme potentialisateur de la virulence de l'agent pathogène.

L'inoculation du virus à l'animal préventivement inoculé par le champignon semble retarder la mortalité d'un ou deux jours. Bien que cette expérience ait été réalisée 2 fois, aucun souriceau n'a survécu au-delà du 6ème jour.

Au regard de ces résultats *in vivo*, nous avons considéré cette espèce fongique comme inactive et avons abandonné son étude.

TABLEAU II - Etude *in vivo* de l'activité anticoxsackie B de 1024 *Hohenbuehelia geogenius* (D.C. ex Fr.) Sing.

Lot	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	Observations
Témoin-eau (Lot de 11 souriceaux)	0	0	0	0	0	0	0	
Champignon (lot de 13 souriceaux)	0	1	0	0	0	0	0	les 12 survivants sont sacrifiés le 26ème jour
Témoin-virus (Lot de 9 souriceaux)	0	2	7	-	-	-	-	
Virus + Champignon (lot de 10 souriceaux)	1	2	0	0	3	3	0	1 survivant, sacri- fié le 26ème jour
Virus — Champignon (Lot de 13 souriceaux)	0	3	3	2	5	-	-	
Champignon — Virus (lot de 12 souriceaux)	0	0	2	2	4	4	-	

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau II

En ce qui concerne l'essai du liquide fongique brut, il donne le même résultat que précédemment : espèce non toxique sur souriceaux, à la dose employée.

Les Témoins-virus meurent le 3ème jour.

Le lot "Virus + Champignon" semble donner des résultats encourageants; la mortalité est nettement retardée jusqu'au 5ème et 6ème jour. L'animal qui a survécu semble cependant être un résultat aberrant et n'est pas pris en considération, une deuxième expérience identique ayant donné 100 % de mortalité au 6ème jour.

L'inoculation virale suivie, 2 heures plus tard, par celle du liquide fongique donne un étalement de la mortalité dans le temps mais ne permet pas une conclusion positive.

L'injection du champignon en "préventif" retarde aussi quelque peu l'apparition des morts, mais nous ne notons aucun survivant au-delà du 6ème jour.

L'étude de *Hohenbuehelia geogenius* a, elle aussi, été abandonnée malgré ces faibles résultats positifs.

TABLEAU III : Etude *in vivo* de l'activité anticoxsackie B de 968 *Pseudoclitocybe cyathiformis*
(Bull. ex Fr. p.p.)Sing.

Lot	Jour							Observations
	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	
Témoin-eau								Absent
Champignon (lot de 9 souriceaux)	0	0	0	0	0	0	0	les animaux sont sacrifiés le 14ème jour
Témoin-virus (lot de 11 souriceaux)	0	2	7	2	-	-	-	
Virus + Champignon (Lot de 13 souriceaux)	1	0	1	2	7	2	-	
Virus — Champignon (lot de 10 souriceaux)	0	0	4	0	0	0	0	les 6 survivants sont sacrifiés le 26ème jour
Champignon — Virus (lot de 11 souriceaux)	2	7	2	-	-	-	-	

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau III

L'étude grossière de la toxicité du liquide de culture s'avère, dans ce cas encore, négative.

L'inoculation du mélange extemporané ne donne qu'un retard de la mortalité.

Le "traitement" par le champignon de la souris infectée donne, dans ce cas, d'assez bons résultats. L'expérimentation a été réalisée sur 2 lots :

- le premier lot a donné 6 survivants sur 10,
- le deuxième lot a donné 5 survivants sur 10.

L'injection du liquide de culture en "préventif" donne des résultats désastreux, dûs à une potentialisation des effets de ces deux éléments.

TABLEAU IV : Etude *in vivo* de l'activité anticoxsackie B de K 93 *Myceena rosella* [(Fr.) Kummer sensu Schroeter, and (if identical) sensu A.H. Smith]

Lot	Jour		1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	Observations
Témoin-eau (lot de 10 souriceaux)			0	0	0	0	0	0	0	
Champignon (lot de 11 souriceaux)			1	0	0	0	1	0	0	les 9 survivants sont sacrifiés le 16e j.
Témoin-virus (lot de 8 souriceaux)			0	1	7	-	-	-	-	
Virus + Champignon (lot de 11 souriceaux)			0	0	0	0	10	1	-	
Virus — Champignon (lot de 10 souriceaux)			0	0	3	3	4	-	-	
Champignon — Virus (lot de 10 souriceaux)			1	0	0	2	7	-	-	

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau IV

Les 2 morts du lot "Champignon" sont considérées comme aberrantes, dues, au moins pour la première, au traumatisme de l'inoculation. Nous considérons donc l'espèce étudiée comme non toxique.

L'inoculation du mélange "Virus + Champignon" provoque un retard dans l'apparition des morts. En effet les 11 souriceaux du lot survivent tous jusqu'au 5ème jour, date à laquelle ils meurent brusquement en moins d'une journée. Lors des quatre premiers jours, les animaux paraissent en bonne santé, s'alimentent normalement et la présence de lait est bien visible dans l'estomac; aucun n'est cyanosé, ni atteint de secousses spastiques. Enfin au 5ème jour ils meurent rapidement. Nous avons alors pensé que ces morts provenaient d'une cause extérieure et avons recommencé l'expérience sur un autre lot : le même résultat (2 morts le 4ème jour, 7 morts le 5ème jour) a été observé.

Les injections retardées du virus ou du champignon ont donné des résultats décevants, la mortalité étant, dans les deux cas, approximativement analogue à celle du lot témoin.

La souche K 93 *Mycena rosella* n'a pas été retenue.

TABLEAU V : Etude *in vivo* de l'activité anticoxsackie B de 855 *Myceua galopoda* (Pers. ex Fr.) Kummer

Lot	Jour	1er						2ème						3ème						4ème						5ème						6ème						7ème						Observations					
Témoin-eau																																												ABSENT					
Championn (lot de 9 souriceaux)		0						0						0						0						0						0						0						sacrifiés le 13ème jour					
Témoin-virus (lot de 10 souriceaux)		1						2						6						1						-						-						-											
Virus+Championn (lot de 12 souriceaux)		1						0						0						2						0						0						0						les 9 survivants sont sacrifiés le 32ème jour					
Virus — Championn (lot de 10 souriceaux)		0						1						1						2						5						0						0						le seul survivant est sacrifié le 33ème jour					
Championn — Virus (lot de 11 souriceaux)		0						0						0						1						0						0						0						les 10 survivants sont sacrifiés le 33ème jour					

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau V

Le lot témoin traité à l'eau physiologique n'a pas été réalisé, par manque momentané de nouveau-nés.

L'inoculation du liquide de culture mycélienne ne modifie en rien l'état des animaux qui sont sacrifiés le 13ème jour.

L'inoculation du mélange permet la survie de la majorité des animaux du lot.

L'effet "curatif" du champignon sur des souriceaux infectés par le virus retarde légèrement la mortalité; en tout état de cause nous notons 100 % de mortalité à la fin du 5ème jour.

L'effet "préventif" du champignon donne de très bons résultats, permettant la survie de plus de 90 % des animaux.

Tous ces survivants sont sacrifiés au terme d'un laps de temps suffisamment long pour que le virus ne puisse plus être pathogène pour l'animal. Nous convenons de fixer cette durée à 1 mois approximativement.

Nous considérons donc le liquide de culture de ce champignon comme doué d'une activité anticoxsackie, dans certaines conditions d'inoculation.

TABLEAU VI : Etude *in vivo* de l'activité antioxsackie B de 849 *Mycena aetites* (Fr.)Quél. ss. Ricken

Jour Lot	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	Observations
Témoin-eau	0	0	0	0	0	0	0	
Championn (lot de 6 sourceaux)	0	0	0	0	0	0	0	sacrifiés le 15ème jour
Témoin-virus (lot de 9 sourceaux)	0	0	9	-	-	-	-	
Virus + Championn (lot de 11 sourceaux)	0	2	7	2	-	-	-	
Virus — Championn (lot de 13 sourceaux)	1	6	6	-	-	-	-	
Championn — Virus (lot de 12 sourceaux)	0	2	4	6	-	-	-	

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau VI

Le liquide de culture de *Mycena aetites* ne montre aucune toxicité pour le souriceau nouveau-né.

Les trois expérimentations concernant les inoculations -simultanées ou non- de la suspension virale et du liquide à tester donnent des résultats proches de ceux fournis par le lot "Témoin-virus".

L'espèce n'a aucune activité *in vivo* et son étude est abandonnée.

Interprétation des résultats du Tableau VIII

Nous ne notons à nouveau aucune toxicité du liquide fongique sur le souriceau.

Les témoins-virus meurent le 4ème et le 5ème jour, c'est-à-dire 1 ou 2 jours plus tard que les mêmes lots des expérimentations précédentes, car la suspension virale a été renouvelée et nous ne retrouvons pas exactement la même dilution.

Les trois modes différents d'inoculation montrent une absence totale d'activité antivirale, les animaux des lots correspondants mourant le même jour que les témoins, et même quelquefois un jour plus tôt.

L'étude de *Mycena iodiolens* a été abandonnée.

TABLEAU IX : Etude *in vivo* de l'activité anticoxsackie B de 834 *Macrolepiota procera* (Scop. ex Fr.) Sing.

Lot	Jour										Observations
	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème				
Témoin-eau											ABSENT
Champignon (lot de 9 souriceaux)	0	2	0	0	0	0	0				les 7 survivants sont sacrifiés le 20ème jour
Témoin-virus (lot de 9 souriceaux)	1	0	1	6	1	-	-				
Virus + Champignon (lot de 11 souriceaux)	0	1	5	5	-	-	-				
Virus — Champignon											ABSENT
Champignon — Virus (lot de 8 souriceaux)	0	1	5	2	-	-	-				

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau VII

Aucune activité toxique du liquide de culture brut sur les souriceaux.

Les animaux du lot "Virus + Champignon" réagissent d'une façon semblable à celle des "Témoins-virus".

Au contraire, nous pouvons noter une action antivirale très forte lorsque le liquide fongique est inoculé à des souriceaux déjà infectés par la suspension virale.

L'inoculation du champignon en "préventif" ne permet pas de retrouver cette action antivirale puisque les souriceaux meurent au 4ème jour, comme les témoins.

Cette souche a été également retenue au vu de son effet curatif sur l'animal.

TABLEAU VIII : Etude *in vivo* de l'activité anticoxsackie B de 544 *Mycena iodiolens* Lund.

Lot	Jour		1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème	Observations
Témoïn-eau										ABSENT
Championn (lot de 10 souriceaux)			0	0	0	0	0	0	0	animaux sacrifiés 1e 12ème jour
Témoïn-virus (lot de 10 souriceaux)			0	1	5	4	-	-	-	
Virus + Championn (lot de 15 souriceaux)			2	1	8	4	-	-	-	
Virus — Championn (lot de 13 souriceaux)			0	2	11	-	-	-	-	
Championn — Virus (lot de 12 souriceaux)			1	0	9	2	-	-	-	

Ces résultats représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

Interprétation des résultats du Tableau IX

Mis à part les deux morts survenues le 2ème jour de l'inoculation du liquide de culture, morts que nous considérons à nouveau comme dues au traumatisme des piqûres, le reste du lot se comporte bien : nous le sacrifions au bout de 3 semaines.

L'injection du mélange extemporané montre que le liquide fongique n'a aucune action inhibitrice *in vitro* sur le virus Cocksackie : les souriceaux meurent en 4 jours.

L'expérience sur le lot "Virus—Champignon" n'a pas été réalisée, par suite de difficultés matérielles momentanées.

L'inoculation du champignon en "préventif" s'avère totalement inefficace.

L'étude de cette espèce est également abandonnée.

2 - DISCUSSION DES RESULTATS DES ETUDES *IN VIVO*

Nous avons déjà constaté, après l'étude du "screening" *in vitro* des 231 souches de champignons, le nombre réduit d'espèces fongiques, douées d'une activité antivirale sur cultures cellulaires; en effet, 9 d'entre elles seulement avaient été retenues pour l'étude *in vivo*.

En effectuant ce deuxième triage, nous espérions vérifier l'activité de ces espèces sur un animal de laboratoire, mais, dans ce cas encore, le nombre de champignons intéressants a été réduit considérablement.

Nous pourrions expliquer ce résultat par le fait que le liquide de culture brut mis en contact avec les cellules infectées peut se révéler antiviral alors que ce même liquide, lorsqu'il est inoculé à l'animal, est souvent dégradé dans l'organisme en plusieurs métabolites qui, eux-mêmes, ne possèdent aucune activité sur le virus.

A l'inverse, nous pourrions aussi constater que les liquides de culture pourraient être actifs *in vivo* tout en ne possédant aucune activité sur cultures cellulaires; cette éventualité se produirait en effet soit pour la même raison que ci-dessus (métabolites à activités différentes de celle du produit brut), soit par stimulation de l'immunité non spécifique; cette dernière notion dépasse cependant le cadre de cette étude et ne relève pas d'un effet antiviral spécifique.

La seule assurance que nous ayons est que ces produits de dégradation -s'ils se forment- ne sont pas toxiques pour le souriceau, aux doses auxquelles ils ont été employés.

Une deuxième constatation s'impose à la lecture de ces résultats : dans tous les cas, aucun changement dans l'état de santé des souriceaux n'a été noté après le 7ème jour; ceci est dû vraisemblablement à la perte quasi totale de la virulence du Coxsackievirus B pour ces souriceaux qui, vraisemblablement pour des raisons de dose infectante moindre, ont résisté au-delà du 6ème jour. Quoiqu'il en soit, même dans les cas où des liquides de culture ont permis la survie des animaux, celle-ci s'est toujours produite avant la fin de la première semaine.

Certaines espèces fongiques ont donné, lors de l'essai d'inactivation *in vitro* du virus, soit un retard de quelques jours dans la mortalité, soit une survie de tous les animaux. Il s'agit de:

- 1024 *Hohenbuehelia geogenius* (Tableau II)
- 968 *Pseudoclitocybe cyathiformis* (Tableau III)
- K 93 *Mycena rosella* (Tableau IV)
- 855 *Mycena galopoda* (Tableau V)

Nous pensons que cette différence de mortalité, par rapport à celle des témoins recevant uniquement le virus, n'est pas due au fait que la suspensor virale, additionnée en quantité égale de liquide de culture fongique, ait été ainsi diluée de moitié. Nous n'avons pas fait systématiquement de témoins "Virus + Eau" en raison du nombre important de souriceaux à traiter simultanément; mais une inoculation de virus correspondant à 50 DL 50 (puisque l'inoculum utilisé est de 100 DL 50) est de toute façon suffisante pour infecter mortellement tous les animaux du lot.

Les espèces précitées pourraient ainsi contenir des substances capables, soit d'inhiber *in vitro* le virus Coxsackie testé, soit d'empêcher, par un processus qui reste à déterminer, l'approche de la cellule-cible ou la pénétration du virus dans les cellules.

Nous pouvons remarquer aussi que certaines cultures mycéliennes ont manifesté une activité antivirale lorsqu'elles étaient injectées deux heures après l'infection des souriceaux par le virus. Il s'agit de :

1024 *Hohenbuehelia geogenius* (Tableau II)

dont le liquide de culture a provoqué un retard de 3 jours dans la mortalité et surtout de :

968 *Pseudoclitocybe cyathiformis* (Tableau III)

246 *Mycena flavoalba* (Tableau VII)

qui ont permis la survie des trois quarts des animaux malades.

Cet essai de "traitement curatif" par le champignon semble donc, dans ces cas, donner des résultats significatifs. Il est intéressant de noter que ces champignons -*Mycena flavoalba* en particulier- sont introduits dans l'organisme alors que le virus a déjà atteint les cellules cérébrales par le seul fait qu'il a été inoculé à l'intérieur de l'encéphale.

Nous avons d'ailleurs procédé trois fois à l'essai "curatif" du liquide de culture de *Mycena flavoalba*, et avons obtenu les résultats suivants

: n° du test	: Nombre de morts		: Témoins-virus
	: au 3ème jour	: au 7ème jour	
: 1	: 0/9	: 2/9	: 100 %
: 2	: 1/11	: 4/11	: 100 %
: 3	: 0/9	: 3/9	: 100 %

Une deuxième constatation s'impose à la lecture de ces résultats : dans tous les cas, aucun changement dans l'état de santé des souriceaux n'a été noté après le 7ème jour; ceci est dû vraisemblablement à la perte quasi totale de la virulence du Coxsackievirus B pour ces souriceaux qui, vraisemblablement pour des raisons de dose infectante moindre, ont résisté au-delà du 6ème jour. Quoiqu'il en soit, même dans les cas où des liquides de culture ont permis la survie des animaux, celle-ci s'est toujours produite avant la fin de la première semaine.

Certaines espèces fongiques ont donné, lors de l'essai d'inactivation *in vitro* du virus, soit un retard de quelques jours dans la mortalité, soit une survie de tous les animaux. Il s'agit de:

- 1024 *Hohenbuehelia geogenius* (Tableau II)
- 968 *Pseudoclitocybe cyathiformis* (Tableau III)
- K 93 *Mycena rosella* (Tableau IV)
- 855 *Mycena galopoda* (Tableau V)

Nous pensons que cette différence de mortalité, par rapport à celle des témoins recevant uniquement le virus, n'est pas due au fait que la suspensor virale, additionnée en quantité égale de liquide de culture fongique, ait été ainsi diluée de moitié. Nous n'avons pas fait systématiquement de témoins "Virus + Eau" en raison du nombre important de souriceaux à traiter simultanément; mais une inoculation de virus correspondant à 50 DL 50 (puisque l'inoculum utilisé est de 100 DL 50) est de toute façon suffisante pour infecter mortellement tous les animaux du lot.

Les espèces précitées pourraient ainsi contenir des substances capables, soit d'inhiber *in vitro* le virus Cocksackie testé, soit d'empêcher, par un processus qui reste à déterminer, l'approche de la cellule-cible ou la pénétration du virus dans les cellules.

Nous pouvons remarquer aussi que certaines cultures mycéliennes ont manifesté une activité antivirale lorsqu'elles étaient injectées deux heures après l'infection des souris par le virus. Il s'agit de :

1024 *Hohenbuehelia geogenius* (Tableau II)

dont le liquide de culture a provoqué un retard de 3 jours dans la mortalité et surtout de :

968 *Pseudoclitocybe cyathiformis* (Tableau III)

246 *Mycena flavoalba* (Tableau VII)

qui ont permis la survie des trois quarts des animaux malades.

Cet essai de "traitement curatif" par le champignon semble donc, dans ces cas, donner des résultats significatifs. Il est intéressant de noter que ces champignons -*Mycena flavoalba* en particulier- sont introduits dans l'organisme alors que le virus a déjà atteint les cellules cérébrales par le seul fait qu'il a été inoculé à l'intérieur de l'encéphale.

Nous avons d'ailleurs procédé trois fois à l'essai "curatif" du liquide de culture de *Mycena flavoalba*, et avons obtenu les résultats suivants

: n° du test	Nombre de morts		: Témoins-virus
	au 3ème jour	au 7ème jour	
: 1	: 0/9	: 2/9	: 100 %
: 2	: 1/11	: 4/11	: 100 %
: 3	: 0/9	: 3/9	: 100 %

Cette méthode semble donc fiable et les résultats sont reproductibles. En effet, nous notons, dans ces trois cas, la survie des deux tiers des animaux traités.

On peut envisager cet éventuel effet antiviral à plusieurs niveaux :

- soit un arrêt de la réplication par action directe sur l'acide nucléique viral,
- soit un blocage de la traduction des protéines capsidales par action sur les RNA-messagers ou les ribosomes cellulaires,
- soit un blocage de la maturation,
- soit encore une induction de la résistance cellulaire à la diffusion virale, donc à l'extension des lésions, d'où la guérison. Dans ce cas nous assisterions peut être à un processus interféron-like.

Il est intéressant de souligner que les souriceaux traités survivants (ou "guéris") ne paraissaient pas atteints de séquelles motrices.

Quoiqu'il en soit, une étude approfondie de ces champignons mériterait d'être entreprise, axée principalement sur le mode d'action des substances responsables et l'histopathologie de l'encéphale, des muscles et de la graisse brune interscapulaire.

L'inoculation du champignon en "préventif", c'est-à-dire deux heures avant l'injection de la suspension virale, a donné également un résultat très encourageant :

855 *Mycena galopoda* (Tableau V),
dont le liquide de culture est très actif sur le virus Coxsackie B, entraînant la survie de pratiquement tous les animaux du lot.

Nous avons d'ailleurs renouvelé l'expérimentation de l'inactivation *in vitro* trois fois, et nous notons les résultats suivants :

n° du test	Nombre de morts		Témoins-virus
	au 3ème jour	au 7ème jour	
1	1/12	3/12	100 %
2	1/9	3/9	100 %
3	0/13	4/13	100 %

Nous avons également renouvelé le test "préventif" cinq fois, et avons obtenu les résultats suivants :

n° du test	Nombre de morts		Témoins-virus
	au 3ème jour	au 7ème jour	
1	2/10	2/10	100 %
2	0/11	1/11	100 %
3	1/14	3/14	100 %
4	1/12	4/12	100 %
5	0/9	1/9	100 %

Il semblerait donc que le liquide de culture de *Mycena galopoda* soit doué d'une activité antivirale présentant plusieurs aspects distincts:

- un effet virulicide, mis en évidence par l'inactivation *in vitro* des virus Coxsackie B quand ils sont mis en incubation avec le liquide fongique pendant une heure;

- un effet virostatique "curatif" très discutable, puisque le liquide de culture ne provoque qu'un retard de la mortalité;
- un effet virostatique "préventif" très net, puisqu'on obtient une survie de pratiquement tous les animaux du lot.

Cette action virostatique en "préventif" peut être expliquée par différents modes d'action :

- soit une stimulation de l'immunité non spécifique,
- soit une induction de la résistance provoquée par un effet interféronogène; il aurait été intéressant de réinoculer le virus après le 7ème jour; malheureusement dans le système choisi, l'infection n'est plus possible du fait de la résistance du souriceau âgé d'une semaine;
- soit un effet de masquage des récepteurs du virus au niveau de la cellule cérébrale, hypothèse qui reste cependant spéculative.

Ce liquide de culture de *Mycena galopoda*, ayant présenté une très intéressante activité antivirale, d'une part à cause de ce double effet virulicide et virostatique et d'autre part en raison de sa très bonne reproductibilité, mérite donc d'être étudié d'une façon plus approfondie et fait l'objet de la troisième partie de notre travail.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PARTICULIERE DE
MYCENA GALOPODA (PERS. ex FR.) KUMMER

C H A P I T R E I

DESCRIPTIONS DU CARPOPHORE
ET DU MYCELIUM EN CULTURE

Position de l'espèce dans la systématique (d'après SINGER)

Classe	: <i>Basidiomycetes</i>
Sous classe	: <i>Hymenomycetinae</i>
Ordre	: <i>Agaricales</i>
Famille	: <i>Tricholomataceae</i> Roze
Tribu	: <i>Marasmieae</i> Fayod
Sous tribu	: <i>Myceninae</i> Sing.
Genre	: <i>Mycena</i> (Pers. ex Fr.) S.F. Gray
Section	: <i>Lactipedes</i>
Espèce	: <i>galopoda</i> (Pers. ex Fr.) Kummer

Les Mycènes sont de petits champignons, à spores blanches, à chapeau campanulé droit, jamais enroulé à la marge, à pied grêle. Leurs carpophores (environ 200 espèces connues dont plus de la moitié se trouve en Europe) font leur apparition déjà en été après des pluies abondantes et principalement pendant les mois humides d'automne.

La mycène à pied laiteux possède un chapeau membraneux, faiblement mamelonné de 1 à 2 centimètres de diamètre, nettement strié au bord, glabre, parfois pruineux, généralement gris ou gris-brun ou gris-olive, parfois pâle ou blanc (variété *alba* Fl. Dan.), parfois brun foncé à noir (variété *nigra* Fl. Dan.).

Les lamelles espacées, adnées ou même presque uncinées sont blanchâtres ou grisâtres, à arête non colorée.

Le stipe (50-60 x 1-2 mm) fragile, fistuleux, allongé, égal ou légèrement épaissi en bas, rigide, avec des fibrilles radicantes à la base, est de couleur analogue à celle du chapeau ou plus pâle; un lait blanc opaque s'écoule à la cassure, mais il est nul par temps sec.

La chair mince et fragile est inodore et à saveur douce.

Les basides tétrasporiques portent des spores (12-13 x 6-7 μ) plus ou moins cylindracées, hyalines, blanches en tas et amyloïdes. Les cystides ont la forme de fuseaux obtus, non en brosse.

Cette mycène pousse en troupes partout sur les feuilles et les aiguilles mortes. Elle n'est pas consommée en raison de sa taille minuscule.

La culture sur milieu gélosé se présente sous forme d'un mycélium aérien blanc, cotonneux, constitué de filaments emmêlés et serrés. Ces hyphes extrêmement fines ont un diamètre compris entre 1,5 et 3 μ ; leurs cloisons transversales sont toutes pourvues de boucles.

CH A P I T R E I I

RECHERCHE DE LA METHODE DE CULTURE OPTIMALE
EN VUE DE L'ACTIVITE ANTICOXSACKIEVIRUS B

1 - INFLUENCE DES MILIEUX DE CULTURE

De travaux antérieurs réalisés au laboratoire, il a été montré (ODDOUX, 1960) que la composition du milieu de culture avait une influence importante sur la production des substances antibiotiques élaborées par les mycéliums de certains champignons en culture, vis-à-vis de bactéries pathogènes. Nous avons également voulu procéder à cette vérification sur la production de substances antivirales à l'encontre des Coxsackievirus B.

1-1 - Composition et préparation de différents milieux de culture

Pour cela, nous utilisons le milieu de formule suivante :

Sucre ou polyol.....	16,5 g
Azote	0,2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Oligo-éléments (sol. de Berthelot).	0,5 ml
Eau distillée Q.S.P.	1 litre

dans lequel nous faisons varier successivement la source d'Azote et la source de Carbone.

Différentes sources d'Azote utilisées

. Azote minéral

Citrate neutre d'ammonium

Nitrate de sodium

. Azote organique

l-asparagine

Acide d-glutamique

l-tryptophane

Hydrolysate de caséine

Nous introduisons dans chaque liquide de culture 0,2 g d'Azote par litre, ce qui représente les quantités suivantes :

1,243 g de citrate neutre d'ammonium

1,214 g de nitrate de sodium

1,071 g de l-asparagine

2,100 g d'acide d-glutamique

1,457 g de l-tryptophane

1,515 g d'hydrolysate de caséine.

Différentes sources de Carbone utilisées

. Sucres

d-Glucose

d-Mannose

d-Fructose

. Polyol

Mannitol

Soit donc au total 6 sources d'Azote et 4 sources de Carbone, représentant ainsi 24 milieux différents.

L'erreur due à l'introduction de Carbone avec certaines sources d'Azote, venant déséquilibrer la proportion de 40 parties de Carbone pour une d'Azote, est considérée comme négligeable.

L'apport des oligo-éléments est fourni par la solution de BERTHELOT, de formule suivante :

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3, 9 \text{ H}_2\text{O}$		50 g
$\text{MnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$		2 g
$\text{CaSO}_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$		0,50 g
$\text{NiCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$		0,05 g
$\text{CoCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$		0,05 g
$\text{TiOSO}_4, 4 \text{ H}_2\text{O}$		0,20 g
$\text{ZnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$		0,10 g
$\text{CuSO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$		0,05 g
$\text{GISO}_4, 4 \text{ H}_2\text{O}$		0,10 g
H_3BO_3		0,05 g
H_2SO_4 à 66° B.		1 ml
Eau distillée Q.S.P.	..	1 litre

Cette solution est filtrée sur papier et conservée à + 4°C.

Chacun des 24 milieux différents est réparti dans 3 erlenmeyers de 100 ml, à raison de 25 ml par fiole. La verrerie a été préalablement traitée comme indiqué dans la première partie (voir page 31)

Les 72 fioles sont stérilisées à l'autoclave à 116°C pendant 20 minutes.

Après refroidissement, on ajoute dans chaque erlenmeyer I goutte de la solution de vitamines, de formule :

Biotine	0,2 mg
Panthoténate de calcium	40 mg
Inositol	200 mg
Acide nicotinique	40 mg
Acide para aminobenzoïque ..	20 mg
Chlorhydrate de pyridoxine .	40 mg
Riboflavine	20 mg
Thiamine	100 mg
Eau distillée Q.S.P.	100 ml

Cette solution est préparée à l'avance, stérilisée par filtration (Sweenex 0,2 μ) et stockée à -20°C après répartition en tubes à hémolyse.

1-2 - Ensemencement du mycélium

Les 3 erlenmeyers renfermant le même milieu sont ensemencés suivant la méthode classique déjà décrite dans la première partie. Ces 72 fioles sont ensuite placées sur l'agitateur dans la chambre obscure à la température de 24°C et au taux d'hygrométrie constant de 70 %.

1-3 - Résultats et Discussions

Après 3 semaines de croissance, les liquides de culture sont recueillis par filtration sur papier, neutralisés à pH 7 et stérilisés par passage à travers la membrane 0,2 μ (cf page 33)

L'étude *in vitro* des liquides des différentes cultures de *Mycena gallopoda* en fonction de chaque paramètre aboutit aux résultats suivants :

Carbone Azote	d-Glucose	d-Mannose	d-Fructose	Mannitol
Citrate neutre d' NH_4	-	-	<u>+</u>	<u>+</u>
NaNO_3	CT	CT	CT	CT
l-asparagine	+	+	+	+
Acide d-glutamique	+	+	+	+
l-tryptophane	+	<u>+</u>	+	<u>+</u>
Hydrolysate de caséine	+	+	+	+

(+) = activité antivirale à la forte concentration virale

(V_1 = 100 DL 50)

(+) = activité antivirale faible ou nulle à la concentration V_1
positive aux concentrations V_2 et V_3

(10 DL 50 et DL 50)

(-) = pas d'activité antivirale à la concentration V_2 et activité
faible ou nulle à la concentration V_3

(CT)= cytotoxique pour les témoins-cellules (HeLa).

Au vu de ces résultats, nous constatons que :

- le citrate neutre d'ammonium utilisé comme seule source d'Azote ne permet pratiquement pas l'apparition de la substance antivirale dans le liquide de culture mycélienne, et ceci, quelque soit le sucre utilisé.
- le milieu au nitrate de sodium donne un liquide de culture toxique pour les cellules néoplasiques en lignée continue. Pour ces quatre expériences, la recherche d'une activité anticoxsackie devient sans signification.
- les sources d'azote telles que : l-asparagine, acide d-glutamique, hydrolysate de caséine et, à un degré moindre l-tryptophane, semblent, séparément, donner de bons résultats dans l'étude *in vitro*.

Il conviendrait, pour approfondir cette étude, d'utiliser des dilutions de ces différents liquides actifs pour comparer avec l'activité du liquide issu du milieu "L". Cette étude n'a pas été réalisée car la mise en évidence de l'activité antivirale sur des cultures cellulaires est uniquement qualitative pour une même dilution de virus.

2 - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE

Nous avons jusqu'à présent toujours cultivé le mycélium en erlenmeyers agités, placés en chambre climatisée. Il nous a semblé intéressant d'étudier, en utilisant le même milieu "L", une autre méthode de culture, afin d'essayer d'augmenter la concentration finale des produits du métabolisme fongique.

La méthode est celle dite "en milieu aéré" décrite par L. ODDOUX (1960).

L'étude *in vitro* des liquides des différentes cultures de *Mycena galopoda* en fonction de chaque paramètre aboutit aux résultats suivants :

Carbone Azote	d-Glucose	d-Mannose	d-Fructose	Mannitol
Citrate neutre d' NH_4	-	-	$\pm$	$\pm$
NaNO_3	CT	CT	CT	CT
l-asparagine	+	+	+	+
Acide d-glutamique	+	+	+	+
l-tryptophane	+	$\pm$	+	$\pm$
Hydrolysate de caséine	+	+	+	+

(+) = activité antivirale à la forte concentration virale

(V_1 = 100 DL 50)

($\pm$) = activité antivirale faible ou nulle à la concentration V_1
positive aux concentrations V_2 et V_3
(10 DL 50 et DL 50)

(-) = pas d'activité antivirale à la concentration V_2 et activité
faible ou nulle à la concentration V_3

(CT)= cytotoxique pour les témoins-cellules (HeLa).

Au vu de ces résultats, nous constatons que :

- le citrate neutre d'ammonium utilisé comme seule source d'Azote ne permet pratiquement pas l'apparition de la substance antivirale dans le liquide de culture mycélienne, et ceci, quelque soit le sucre utilisé.
- le milieu au nitrate de sodium donne un liquide de culture toxique pour les cellules néoplasiques en lignée continue. Pour ces quatre expériences, la recherche d'une activité anticoxsackie devient sans signification.
- les sources d'azote telles que : l-asparagine, acide d-glutamique, hydrolysate de caséine et, à un degré moindre l-tryptophane, semblent, séparément, donner de bons résultats dans l'étude *in vitro*.

Il conviendrait, pour approfondir cette étude, d'utiliser des dilutions de ces différents liquides actifs pour comparer avec l'activité du liquide issu du milieu "L". Cette étude n'a pas été réalisée car la mise en évidence de l'activité antivirale sur des cultures cellulaires est uniquement qualitative pour une même dilution de virus.

2 - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE

Nous avons jusqu'à présent toujours cultivé le mycélium en erlenmeyers agités, placés en chambre climatisée. Il nous a semblé intéressant d'étudier, en utilisant le même milieu "L", une autre méthode de culture, afin d'essayer d'augmenter la concentration finale des produits du métabolisme fongique.

La méthode est celle dite "en milieu aéré" décrite par L. ODDOUX (1960).

2-1 - Matériel utilisé

Le principe est de faire barboter de l'air stérile dans le liquide de cultureensemencé, contenu dans un ballon de 6 litres à fond plat.

L'air provenant d'un compresseur est d'abord déshuilé puis débarrassé de tout germe par passage à travers une allonge de coton cardé (stérilisée préalablement au four Pasteur à 180°C pendant 1 heure). Il est ensuite humidifié par barbotage dans de l'eau distillée stérile, afin de ne pas entraîner une partie de l'eau du milieu de culture, ce qui modifierait les concentrations en produits initiaux.

Le ballon contenant 3 litres de milieu est préalablement stérilisé à l'autoclave (116°C pendant 20 minutes). Le débit d'air pulsé qui arrive dans le liquideensemencé est réglé grâce à une pince à vis.

2-2 - Préparation de la mère

Comme nous l'avons déjà écrit dans la première partie, la souche de *Mycena galopoda* est conservée en vie ralentie sur milieu gélosé en chambre obscure à + 4°C. Il faut donc activer la croissance du champignon en le repiquant préalablement sur milieu liquide "L" (cf formule page 31). Au bout d'une quinzaine de jours à la température de 24°C, le mycélium atteint un stade de développement suffisant pour servir de mère d'ensemencement.

2-3 - Ensemencement proprement dit

A l'intérieur d'une salle aseptique, et sous le rayonnement de lampes bactéricides, le mycélium obtenu précédemment est broyé dans

du liquide de culture à l'aide d'un homogénéiseur* stérile, de façon à fragmenter le plus possible les filaments, augmentant ainsi le nombre des particules qui donneront naissance à de nouvelles hyphes; l'homogénéisat est ensuite versé aseptiquement dans les 3 litres de milieu contenus dans le ballon à fond plat. Celui-ci est placé sur un agitateur magnétique (nous utilisons des barreaux aimantés en téflon qui résistent bien à la stérilisation), après avoir été obturé par un bouchon en versilic traversé par les tubulures d'entrée et de sortie d'air pulsé. L'ensemble est porté en chambre obscure à 24°C et au taux d'hygrométrie constant de 70 %.

Nous arrêtons la culture au bout de 22 jours.

2-4 - Expérimentation et résultats

Comme nous l'avons déjà décrit (cf page 33), le mycélium et le liquide sont prélevés stérilement, congelés à -70°C, puis décongelés et filtrés sur papier sous exposition de lampes à U.V. Le pH est ramené à 7,2 et le liquide à tester est ensuite stérilisé par filtration (Sweenex 0,2 μ), puis conservé à -70°C après répartition en tubes à hémolyse.

Le test antiviral s'effectue de la même manière que celle décrite lors de notre recherche systématique (cf page 48).

Le liquide provenant des cultures en erlenmeyer agité et celui obtenu en ballon sont testés sur une même plaque, donc avec le même nombre de cellules et avec les mêmes solutions virales aux trois dilutions précédemment titrées.

*Homogénéiseur M.S.E. Réf. : 110/220 Measuring and Scientific Equipment Ltd, Spencer Street, London, représenté en France par O.S.I.

Bien que nous ne puissions pas donner de résultats quantitatifs en dénombrant les cellules accrochées au fond des alvéoles, il nous est cependant permis de comparer l'activité antivirale des 2 liquides de culture testés.

- à la concentration virale la plus faible, les échantillons 855 E (cultivé en erlenmeyer) et 855 B (cultivé en ballon) possèdent la même activité : les fonds des alvéoles sont couverts d'une façon uniforme ressemblant à ceux des témoins cellulaires;
- à la concentration virale moyenne : même résultat,
- à la concentration virale forte, 855 E donne un tapis d'îlots cellulaires presque confluent alors que 855 B ne donne plus que 3 ou 4 amas cellulaires d'une trentaine de cellules chacun.

On peut donc en déduire que la méthode de culture en erlenmeyer agité permet une libération des métabolites fongiques supérieure à celle produite avec l'autre méthode. Peut être une agitation plus forte, une aération moins importante et un ensemencement en mycélium plus riche, sont-ils à l'origine de cette constatation.

3 - CINETIQUE D'APPARITION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE

3-1 - Méthode utilisée

Pour rechercher la durée de croissance du mycélium permettant la meilleure activité anticoxsackie, nous avons réalisé le même montage que précédemment en remplaçant le ballon à fond plat par un ballon identique, mais muni à sa base d'un robinet à vis.

Après une semaine de croissance, nous opérons les prélèvements tous les 3 jours et les testons immédiatement sur cultures cellulaires.

3-2 - Résultats

Les résultats suivants sont obtenus :

Concentration virale Jour du prélèvement	V ₁	V ₂	V ₃
8ème jour	-	-	-
11ème jour	-	-	-
14ème jour	-	-	<u>+</u>
17ème jour	+	+	+
20ème jour	+	+	+
23ème jour	+	+	+
26ème jour	Abs.	Abs.	Abs.
29ème jour	-	+	+
32ème jour	-	+	+
35 ème jour	-	-	-

(+) = liquide actif sur les Coxsackie B₁

(+) = faible activité à la concentration étudiée (environ la moitié du tapis cellulaire est encore accroché)

(-) = pas d'activité sur le virus

V₁ = 100 DL 50

V₂ = 10 DL 50

V₃ = DL 50

Les résultats du 26ème jour manquent car la plaque de microtitration utilisée ce jour-là a été contaminée, tuant toutes les cellules.

Cette étude de la cinétique permet donc de mettre en évidence d'une façon relativement précise, l'apparition des métabolites fongiques à activité antioxydante.

Nous conviendrons, comme nous l'avons déjà décidé au début de nos travaux, de limiter la croissance à trois semaines.

C H A P I T R E I I I

ETUDES BIOLOGIQUE ET CHIMIQUE
DU LIQUIDE DE CULTURE

1 - ETUDE DE LA TOXICITE

Sans vouloir procéder à une évaluation précise de la toxicité du liquide de culture de *Mycena galopoda*, nous avons voulu cependant savoir si ce liquide était -ou non- doté d'une certaine toxicité pour l'animal. Nous avons pu déjà nous rendre compte de son innocuité sur les souriceaux puisqu'il avait été inoculé à raison de 0,2 ml par voie sous-cutanée et de 0,1 ml par voie intra-péritonéale. Nous avons d'ailleurs eu l'occasion de répéter cette expérimentation de très nombreuses fois au cours de cette étude et nous n'avons jamais enregistré de morts, sauf ceux apparaissant dans les premières vingt quatre heures et dûs aux traumatismes toujours possibles des inoculations.

Nous avons testé le liquide de culture tamponné à pH 7 sur souris adultes en inoculant par voie intra-péritonéale 0,5 ml de liquide à chacune des dix souris d'un lot. Un lot témoin est parallèlement traité par une injection de soluté chloruré isotonique. Les souris sont pesées tous les jours et nous n'observons, mis à part pendant les trois premiers jours de l'expérience, aucune perte de poids par rapport au lot témoin. Les souris s'alimentent normalement; elles sont sacrifiées au bout de 4 semaines.

Les mêmes expérimentations ont été réalisées en utilisant le liquide de culture à deux concentrations plus fortes :

- liquide brut concentré deux fois = C_2
- C_2 concentré deux fois à son tour = C_4

Aussi bien avec le liquide C_2 qu'avec C_4 , les mêmes résultats ont été obtenus, c'est-à-dire la survie de toutes les souris

adultes des deux lots. Nous pensons donc que le liquide de culture n'est pas toxique.

Cette étude de la toxicité telle qu'elle vient d'être envisagée est celle d'une toxicité aiguë, appréciée sur l'animal ayant reçu une seule injection du liquide à tester. La détermination de la toxicité chronique, apparaissant à longue échéance et à la suite d'administrations répétées du liquide, n'a pas été réalisée.

2 - RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTIVIRALE SUR D'AUTRES VIRUS QUE LE COXSACKIEVIRUS B₁

Pour effectuer cette recherche, nous avons dû nous limiter aux virus se développant facilement sur les cellules en culture ou sur les souris, pour les mêmes raisons que celles déjà décrites dans la première partie de notre travail.

2-1 - Essais sur les Coxsackievirus B

Le liquide de culture de *Myxoma gallopoda* étant actif sur le sérotype 1 du groupe B des Coxsackievirus, nous avons testé tout d'abord ce liquide sur les 5 autres sérotypes du groupe B.

Souches prototypes utilisées :

B₂ : Ohio-1

B₃ : Nancy

B₄ : J.V.B.

B₅ : Faulkner

B₆ : Schmitt

2-1-1 - étude in vitro

L'expérimentation se déroule d'une manière identique à celle employée lors de notre recherche systématique.

La lecture du fond des alvéoles se fait au bout de 48 heures. Les colonnes de la plaque correspondant aux différents "témoins-virus" sont constituées d'alvéoles dont le fond ne possède plus aucune cellule accrochée à la paroi.

Aux mêmes dilutions V_1 , V_2 et V_3 des différents sérotypes B_1 , la lecture des plaques de microtitration a donné les résultats suivants:

Dilution virale	Sérotypes utilisés	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
V_1		+	+	+	-	+	
V_2		+	+	+	+	+	
V_3		+	+	+	+	+	

(+) = activité antivirale

(-) = inactif

V_1 = 100 DL 50

V_2 = 10 DL 50

V_3 = DL 50

Nous constatons, à la lecture de ces résultats, que seul le sérotype 5 n'est pas inhibé à la dilution forte 100 DL 50. Peut-être avons-nous été en présence d'une souche particulièrement virulente, ce qui expliquerait ce résultat. Tous les autres virus du groupe B semblent réagir comme le sérotype 1, c'est-à-dire sont sensibles à l'action *in vitro* du liquide de culture mycélienne.

2-1-2 - Etude in vivo

Les expérimentations sur souriceaux nouveau-nés ont été effectuées selon le même processus, déjà décrit dans la deuxième partie. Seul le lot "Virus—Champignon", c'est-à-dire l'essai de l'activité "curative" du champignon, qui n'avait donné aucun résultat intéressant sur le sérotype 1, n'a pas été réalisé.

Les résultats contenus dans les tableaux qui suivent représentent le nombre d'animaux morts relevés journellement.

2-1-2-1 - essai sur le sérotype B₂

Lot	Jour							Observations
	1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	
Témoin-virus (6 souriceaux)	0	0	4	2	-	-	-	
Virus + Champignon (8 souriceaux)	0	0	0	2	6	-	-	
Champignon—Virus (8 souriceaux)	0	0	0	0	4	0	0	les 4 survivants sont sacrifiés le 13e jour

Il apparait que le sérotype 2, bien que très sensible *in vitro* à l'action du liquide fongique, ne donne pas, sur animal, d'aussi bons résultats que le sérotype 1. Seule l'action "préventive" du champignon permet un retard de la mortalité et une diminution de son taux.

2-1-2-2 - essai sur le sérotype B₃

Lot \ Jour	1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	Observations
Témoin-virus (8 souriceaux)	0	0	7	1	-	-	-	
Virus + Champignon (10 souriceaux)	1	0	0	0	3	0	0	les 6 survivants sont sacrifiés le 16e jour
Champignon—Virus (12 souriceaux)	0	0	0	0	0	0	0	les animaux sont sa- crifiés le 16e jour

Le virus Coxsackie B₃ semble donc réagir d'une manière identique à celle du sérotype 1, donnant les meilleurs résultats en action "préventive".

2-1-2-3 - essai sur le sérotype B₄

Lot \ Jour	1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	Observations
Témoin-virus (4 souriceaux)	0	0	4	-	-	-	-	
Virus + Champignon (7 souriceaux)	0	0	4	3	-	-	-	
Champignon—Virus (13 souriceaux)	1	0	0	0	0	0	0	les 12 survivants sont sacrifiés le 17e jour

L'inoculation du mélange extemporané ne provoque aucune amélioration de l'état des souriceaux qui meurent, comme les témoins, au 4e jour. L'action "préventive" du champignon montre, au contraire, une survie de pratiquement tous les nouveau-nés.

2-1-2-4 - essai sur le sérotype B₅

Lot \ Jour	1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	Observations
Témoin-virus (7 souriceaux)	0	0	1	6	-	-	-	
Virus + Champignon (11 souriceaux)	1	0	8	2	-	-	-	
Champignon—Virus (12 souriceaux)	3	1	1	7	-	-	-	

Quelque soit le mode d'inoculation employé, le liquide de culture fongique se montre strictement inactif sur le sérotype 5. Cette expérimentation a été renouvelée dans les mêmes conditions et a donné des résultats analogues.

2-1-2-5 - essai sur le sérotype B₆

Lot \ Jour	1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	Observations
Témoin-virus (10 souriceaux)	1	0	6	3	-	-	-	
Virus + Champignon (14 souriceaux)	2	0	0	3	0	1	0	les 8 survivants sont sacrifiés le 21e jour
Champignon—Virus (14 souriceaux)	0	0	0	0	2	0	0	les 12 survivants sont sacrifiés le 21e jour

Nous pouvons constater, dans ce dernier cas, que les 2 modes différents d'inoculation du champignon et du virus donnent de très bons résultats et que le liquide de culture est actif sur le sérotype B₆.

En conclusion de cette étude, nous pouvons affirmer que, sauf en ce qui concerne le sérotype 5, les Cocksackievirus du groupe B sont inhibés par le liquide de culture mycélienne de *Mycena galopoda*.

Cette analogie de résultats pour un même groupe de virus nous a conduit à expérimenter notre liquide de culture sur l'autre groupe des Cocksackievirus : le groupe A.

2-2 - Essai du liquide fongique sur quelques Cocksackievirus groupe A

Les sérotypes contenus dans ce groupe ne se développant en général pas sur des cultures de cellules en lignée continue, l'expérimentation n'a pu être faite qu'*in vivo*.

Des lots de souriceaux nouveau-nés sont constitués d'une manière analogue à celle décrite pour l'expérimentation *in vivo* des espèces actives sur les Cocksackie B₁ : huit à douze souriceaux, âgés de 24 heures, provenant, lorsque cela était possible, de 2 portées différentes, sont introduits dans une cage avec une mère venant de mettre-bas.

Nous n'avons pas étudié l'activité du mycélium sur les 23 sérotypes du groupe A des Cocksackievirus, mais seulement sur les 2 types dont nous avons pu disposer (1) :

- le sérotype A₂, souche prototype : Fleetwood
- le sérotype A₉, souche prototype : Bozek.

(1) Nous tenons à remercier Madame Janine BRINGUIER pour son amabilité et son dévouement à notre égard.

Les deux modes différents d'inoculation :

- "Champignon + Virus"
- "Champignon—Virus"

n'ont pas permis de mettre en évidence, dans le liquide de culture, une activité anticoxsackie A; le taux de mortalité a en effet été identique à celui des témoins, au bout d'une période sensiblement la même (3 à 5 jours).

Il semblerait donc que le liquide de culture de *Mycena galopoda* soit doté d'une activité sur les Coxsackie, spécifique du groupe B.

Nous avons alors pensé qu'il serait intéressant de tester ce liquide sur un virus n'appartenant pas au groupe des Entérovirus, par exemple, le virus herpétique type 1.

2-3 - Recherche d'une activité antiherpétique

Nous avons utilisé la même méthode que celle qui nous a servi à réaliser notre recherche systématique *in vitro* (voir première partie). Aux dilutions V_1 , V_2 et V_3 de la suspension du virus herpétique (correspondant respectivement à 100 DL 50, 10 DL 50 et DL 50), nous avons constaté que les fonds des alvéoles correspondants ne possédaient plus aucune cellule intacte; seules quelques cellules isolées, subglobuleuses, brillantes étaient encore accrochées au fond de la plaque de microtitration.

2-4 - Discussion

Bien que ces expérimentations sur différents virus ne soient pas suffisantes, quant au nombre de virus étudiés, pour con-

clure d'une façon certaine, il semblerait à priori que le liquide de culture de *Mycena galopoda* soit doté d'une activité assez spécifique. Il conviendrait toutefois de compléter cette étude par la recherche d'une éventuelle activité sur les virus poliomyélitiques et ECHO. Nous pouvons cependant déduire de ces résultats que l'un des modes d'action que nous avons supposé à la fin de l'expérimentation *in vivo* -à savoir un effet possible de stimulation de l'immunité non spécifique- devient tout à fait improbable, au vu de l'absence totale d'activité sur le virus herpétique type 1.

3 - ESSAIS D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

Afin de procéder à une extraction du principe actif dans les meilleures conditions, il nous a fallu tout d'abord cultiver le mycélium de *Mycena galopoda* en grande quantité.

3-1 - Obtention du liquide de culture

Comme nous avons déjà constaté que la culture du mycélium en erlenmeyers agités produisait une quantité de substances antivirales supérieure à celle obtenue avec la méthode en "milieu aéré", nous avonsensemencé 480 erlenmeyers de 100 ml, disposés ensuite sur les plateaux de l'agitateur rotatif placé en chambre de culture.

Après 21 jours de croissance, nous séparons les boules de mycélium du liquide de culture par filtration sur un filtre-presse* (la pression utilisée est de 0,5 kg au début, puis 2 à 3 kg en fin de filtration.)

*Filtre-presse GAUTHIER, Réf.: CNDT; B.P.21, 93001 BOBIGNY

Nous obtenons ainsi 6,250 litres d'un liquide limpide, de couleur claire, jaune-ambré, de pH 3,4. Il est immédiatement concentré sous vide, dans un appareil type "cyclone", à la température de 25°C environ, jusqu'à l'obtention d'une quantité de liquide égale à 625 ml, qui correspond à une concentration de 10 fois.

3-2 - Essais d'extraction par divers solvants organiques

Nous avons tout d'abord essayé d'extraire la substance -ou les substances- antivirale à l'aide des principaux solvants organiques communément employés en chimie extractive.

Les solvants d'extraction suivants, classés par ordre de force d'élution croissante, ont été utilisés :

- éther de pétrole
- tétrachlorure de carbone
- benzène
- chloroforme
- acétate d'éthyle
- méthylisobutylcétone
- alcool butylique

3-2-1 - Mode opératoire

Nous avons employé, pour chacun de ces solvants, le mode opératoire suivant : le liquide fongique concentré est additionné de solvants organiques, dans les proportions respectives de 2 volumes pour 1 volume, dans une ampoule à décantation. Le mélange (60 ml de liquide + 30 ml de phase organique) est agité vigoureusement pendant 20 minutes. La phase aqueuse est récupérée, additionnée à nouveau de 30 ml de solvant neuf et ainsi de suite

Nous répétons cette extraction cinq fois, jusqu'à ce que tout ce qui peut être extrait par le solvant organique ait disparu du liquide de culture.

La phase aqueuse est évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif* à la température de 37°C et reprise par la quantité minima d'eau distillée.

Les cinq phases organiques sont mélangées, évaporées à sec sous vide; le résidu est repris par l'eau distillée jusqu'à obtenir une concentration voisine de celle du milieu initial.

Ces deux solutions provenant, l'une de la phase aqueuse, l'autre de la phase organique, sont tamponnées à pH 7, stérilisées par filtration stérilisante (membrane Sweenex 0,2 μ), et testées *in vitro* sur cultures de cellules KB, en utilisant le virus Coxsackie B₁ aux trois dilutions habituelles.

3-2-2 - Résultats

- Les essais avec les quatre premiers solvants d'extraction (éther de pétrole, tétrachlorure de carbone, benzène, chloroforme) donnent les mêmes résultats, c'est-à-dire :
 - . la phase aqueuse est limpide, jaune-ambré; elle est active sur le virus Coxsackie à la dilution la plus forte V₁.
 - . la phase organique se présente comme une émulsion incolore, elle ne permet pas la survie des cellules KB mises en contact avec le virus.
- L'extraction par l'acétate d'éthyle montre que :
 - . la phase aqueuse (phase inférieure) est jaune, limpide, active sur le virus;

*Evaporateur rotatif Büchi. Réf.: 89802

- . phase organique (phase supérieure) est incolore, limpide et inactive.

Nous pouvons donc déjà déduire de ces deux premiers résultats que le principe antiviral n'est pas une substance lipidique.

- L'extraction par la méthylisobutylcétone permet la séparation du liquide de culture en deux phases :

- . la phase aqueuse (phase inférieure) est limpide, jaune-ambré clair, inactive;
- . la phase organique (phase supérieure) est limpide, jaune-citrin clair, active sur la dilution forte du Coxsackievirus.

- L'extraction par l'alcool butylique donne les résultats suivants :

- . la phase aqueuse est jaune, limpide, toxique pour les cellules KB;
- . la phase organique est incolore, limpide, toxique pour les cellules KB.

Cette cytotoxicité est révélée grâce aux témoins "Champignon" de la colonne 2 des plaques de microtitration (cf page 55).

3-2-3 - Conclusions

Parmi les 7 solvants d'extraction utilisés, seule la méthylisobutylcétone semble avoir extrait le principe actif, tout en ne manifestant aucune toxicité pour les cellules en culture. Nous avons

donc choisi d'utiliser ce solvant organique pour extraire la substance active en grande quantité.

3-2-4 - Extraction par la méthylisobutylcétone

Nous cultivons à nouveau le mycélium de *Mycena galopoda* en erlenmeyers agités et obtenons 5,700 litres de liquide de culture (pH 3,6) à la sortie du filtre-presse. La concentration au cyclone est effectuée jusqu'à un volume final de 500 ml qui est traité par 250 ml de méthylisobutylcétone pendant 20 minutes. Dix extractions successives sont ainsi réalisées.

Les phases organiques (jaune-citrin jusqu'à la 4ème extraction, puis incolores à partir de la 5ème) sont mélangées et concentrées sous vide à la température de 37°C; elles sont reprises par 15 ml de méthylisobutylcétone.

La phase aqueuse et 1 ml de la phase organique reprise par l'eau, sont testées sur cellules pour vérifications.

L'essai d'une séparation plus fine de l'extrait organique est alors réalisée par chromatographie sur couche mince.

Nous avons utilisé des plaques de silice* sur lesquelles nous déposons environ 2 ml d'extrait organique.

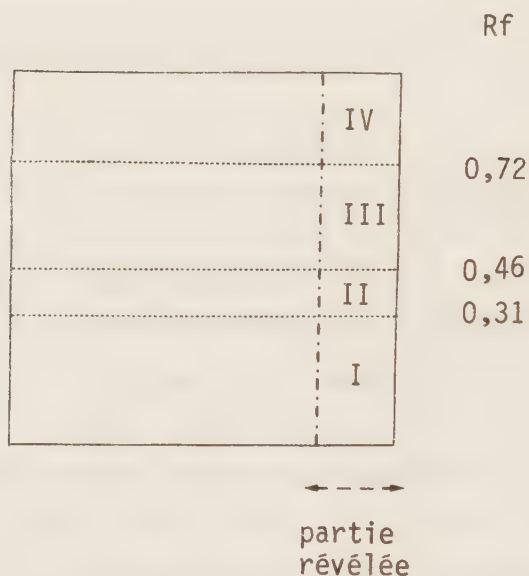
L'élution, d'une durée de 2 heures environ, se réalise à l'aide du mélange :

Chloroforme	3 volumes
Acétone	2 volumes

*DC - Fertigplatten Kieselgel 60 (20 x 20 cm) Art. 5721 MERCK

DARMSTADT (R.F.A.)

Après séchage, la plaque est révélée à l'aide d'une vaporisation d'acide sulfurique pur.



Front du solvant : 15,5 cm

La plaque de chromatographie n'est révélée que sur une petite partie (l'extrémité droite par exemple) d'environ 5 cm de large, ce qui permet de récupérer le reste de la silice qui n'a pas été en contact avec l'acide sulfurique.

Nous pouvons ainsi constater 4 zones bien distinctes, chaque bande étant constituée de plusieurs spots, colorés ou non. Les parties non révélées de la plaque de chromatographie correspondant à chaque bande sont récupérées par grattage dans des exsiccateurs.

Dans une petite colonne de verre (diamètre 1 cm), nous déposons la poudre de silice, retenue par une membrane en verre fritté. La partie effilée de l'extrémité inférieure est introduite

donc choisi d'utiliser ce solvant organique pour extraire la substance active en grande quantité.

3-2-4 - Extraction par la méthylisobutylcétone

Nous cultivons à nouveau le mycélium de *Mycena galopoda* en erlenmeyers agités et obtenons 5,700 litres de liquide de culture (pH 3,6) à la sortie du filtre-presse. La concentration au cyclone est effectuée jusqu'à un volume final de 500 ml qui est traité par 250 ml de méthylisobutylcétone pendant 20 minutes. Dix extractions successives sont ainsi réalisées.

Les phases organiques (jaune-citrin jusqu'à la 4ème extraction, puis incolores à partir de la 5ème) sont mélangées et concentrées sous vide à la température de 37°C; elles sont reprises par 15 ml de méthylisobutylcétone.

La phase aqueuse et 1 ml de la phase organique reprise par l'eau, sont testées sur cellules pour vérifications.

L'essai d'une séparation plus fine de l'extrait organique est alors réalisée par chromatographie sur couche mince.

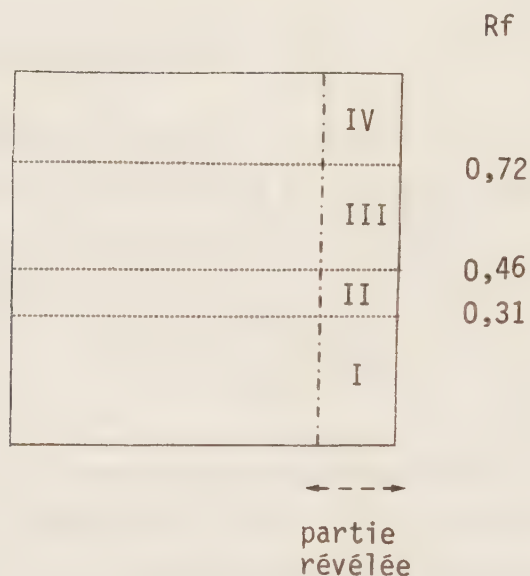
Nous avons utilisé des plaques de silice^{*} sur lesquelles nous déposons environ 2 ml d'extrait organique. L'élution, d'une durée de 2 heures environ, se réalise à l'aide du mélange :

Chloroforme	3 volumes
Acétone	2 volumes

^{*}DC - Fertigplatten Kieselgel 60 (20 x 20 cm) Art. 5721 MERCK

DARMSTADT (R.F.A.)

Après séchage, la plaque est révélée à l'aide d'une vaporisation d'acide sulfurique pur.



Front du solvant : 15,5 cm

La plaque de chromatographie n'est révélée que sur une petite partie (l'extrémité droite par exemple) d'environ 5 cm de large, ce qui permet de récupérer le reste de la silice qui n'a pas été en contact avec l'acide sulfurique.

Nous pouvons ainsi constater 4 zones bien distinctes, chaque bande étant constituée de plusieurs spots, colorés ou non. Les parties non révélées de la plaque de chromatographie correspondant à chaque bande sont récupérées par grattage dans des exsiccateurs.

Dans une petite colonne de verre (diamètre 1 cm), nous déposons la poudre de silice, retenue par une membrane en verre fritté. La partie effilée de l'extrémité inférieure est introduite

à travers le bouchon d'une fiole à vide. Peu à peu, nous versons la méthylisobutylcétone qui, traversant la couche de silice, est aspirée par le vide maintenu dans la fiole. Le solvant doit être utilisé abondamment (environ 50 ml), jusqu'à ce que tous les produits retenus par la silice soient élués.

Les quatre éluats ainsi obtenus, correspondant aux 4 zones de la plaque de chromatographie, sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif. Les résidus sont repris par l'eau bidistillée, neutralisés à pH 7 si besoin est, stérilisés par filtration (membrane 0,2 μ) et testés sur cellules KB infectées par le virus Cocksackie.

Seul l'extrait II (correspondant à la bande II de Rf compris entre 0,31 et 0,46) est actif sur le virus. Les 3 autres zones sont inactives.

Chromatographie de la bande II active

1 ml de l'éluat organique est déposé sur une nouvelle plaque de chromatographie. La révélation à l'acide sulfurique donne les résultats suivants :

<u>Bande colorée</u>	<u>Rf</u>	
fluorescence pâle jaune-ocre pâle	0,96	
bleu-violet	0,65	IIème zone
jaune soufre intense	0,43	- - - - -
rose	0,41	
bleu-vert	0,36	Ière zone
rose	0,31	

Comme précédemment, nous récupérons la silice correspondant à chacune des 2 zones bien distinctes et en effectuons l'élution. Seule la première zone (correspondant aux 4 bandes de 0,31 à 0,43) est active sur le virus.

Nous avons alors essayé différents solvants de chromatographie, en utilisant le plus souvent des mélanges de solvants, sans aboutir à une séparation meilleure que celle obtenue par cette méthode.

La chromatographie sur colonne en basse pression, couplée à un spectrophotomètre U.V. muni d'un collecteur de fractions, n'a pas non plus permis une purification appréciable.

Les difficultés dues à l'extraction par les solvants organiques nous ont parfois contraint à abandonner une méthode qui semblait cependant donner de bons résultats. En effet, il nous est souvent arrivé de recueillir un extrait organique qui, une fois concentré à sec, ne permettait plus une solubilisation dans l'eau, donc nous mettait dans l'impossibilité de le tester sur des cultures de cellules humaines.

Il semblerait donc que la substance antivirale recherchée ne soit pas véritablement hydrosoluble, mais seulement en suspension dans le milieu aqueux très dilué que représente le liquide de culture brut.

Cette constatation nous a donc obligé à rechercher une autre méthode de séparation, et en particulier d'élimination des sucres qui donnent au liquide très concentré que nous utilisons, une forte viscosité gênant nos manipulations.

3-3 - Essais de séparation par d'autres procédés

3-3-1 - Dialyse

Afin de séparer les grosses molécules des petites, et surtout d'éliminer une partie des sucres, nous introduisons 415 ml de liquide de culture concentré (correspondant à 5,5 litres de liquide

brut), dans des tubes à dialyse^x que nous plaçons dans de l'eau distillée en chambre froide à + 4°C pendant 3 jours.

Les bains de dialyse sont changés tous les jours. Le premier bain est nettement jaune clair, les autres sont incolores. Tous ces bains (environ 45 litres) sont mélangés, concentrés sous vide (à 28°C environ) jusqu'à obtenir un liquide jaune-brun, sirupeux. Un ml de ce concentré est dilué au 1/10ème avec de l'eau distillée, puis stérilisé par filtration; il se révèle inactif *in vitro* sur le virus Cocksackie.

Le résidu de dialyse est récupéré, filtré sur membrane 0,2 µ; 1 goutte de ce liquide, même dilué au 1/2, permet la survie de toutes les cellules présentes dans les alvéoles contenant le virus. Nous pouvons donc en déduire que le principe actif est une substance d'un poids moléculaire supérieur à 8000.

Le contenu des tubes de dialyse est concentré à sec, sous vide, repris par un minimum d'eau distillée (35 ml) puis additionné de 4 volumes d'éthanol pur. Le mélange est placé sur un agitateur magnétique pendant une nuit à la température de + 4°C. Le précipité est recueilli par centrifugation, dissous dans l'eau et testé, ainsi que le surnageant alcoolique préalablement remis en phase aqueuse, sur le virus *in vitro* : la substance antivirale se trouve dans le précipité alcoolique. L'opération est renouvelée sur ce même précipité de manière à obtenir une solution contenant la substance avec le moins d'impuretés possible.

^xDialysis membrane, Union Carbide Réf. : 24C06. POLYLABO

3-3-2 - Essai d'élimination biologique des sucres

Le précipité alcoolique repris par l'eau donne un liquide de consistance sirupeuse bien que les sucres de faible poids moléculaire aient été préalablement éliminés par la dialyse. Cette technique semble donc se révéler insuffisante pour priver le liquide de culture de *Mycena galopoda* des sucres qui gênent l'extraction des principes actifs.

Nous avons alors envisagé une autre méthode d'élimination des sucres du liquide de culture en les faisant métaboliser par une levure. *Trichosporon terrestre* sp. nov. a été choisie en raison de son pouvoir d'assimilation d'un très grand nombre de substrats carbonés et en particulier du mannitol, polyol qui se trouve en abondance chez les champignons supérieurs.

Le liquide de cultureensemencé avec une suspension de spores du *Trichosporon* est placé sur l'agitateur rotatif et nous laissons la levure se développer pendant 5 jours. Après une filtration stérilisante, le liquide est testé *in vitro* sur le Cocksackievirus B : il a perdu toute son activité antivirale.

La levure *Trichosporon terrestre* a donc métabolisé la substance antivirale recherchée; cette méthode de purification a dû être abandonnée.

3-3-3 - Purification par chromatographie sur
colonne de cellulose

Le précipité alcoolique mis en solution aqueuse, dialysé préalablement pendant une nuit contre un tampon phosphate à pH 8, est placé dans une colonne de DEAE cellulose*, en éluant de 10 ml en 10 ml par des solutions de NaCl de molarités croissantes de 0,01 M à 1 M.

Tampon phosphate pH 8 :

il se réalise à l'aide des solutions mères suivantes :

- solution mère A : KH_2PO_4 9,08 g

- solution mère B : K_2HPO_4 , 12 H_2O 23,88 g

Pour constituer 1 litre de tampon, les deux solutions sont mélangées dans les proportions suivantes :

- solution A 960 ml

- solution B 40 ml

Nous n'avons pas réalisé l'élution en gradient linéaire de molarité, en raison du nombre trop élevé d'échantillons à tester sur le virus.

Nous obtenons ainsi 12 éluats dont nous réalisons l'analyse spectrophotométrique à 3 longueurs d'onde de l'U.V. :

200 nm - 224 nm - 280 nm

*DEAE cellulose BIO-RAD Laboratories Réf. : 748.0550

32 nd & GRIFFIN RICHMOND,
CALIFORNIE U.S.A.

Longueur d'onde	200 nm	224 nm	280 nm
NaCl			
0,01 M	0	0	0
0,02 M	0,07	0,01	0,01
0,04 M	0	0	0
0,06 M	0	0	0
0,08 M	0	0	0
0,1 M	0	0	0,02
0,2 M	0	0	0,01
0,3 M	0,17	0,12	0,04
0,4 M	2	2	1,2
0,6 M	0,06	0,05	0
0,8 M	0,12	0,05	0,02
1 M	0,15	0,02	0

Densité optique des éluats à différentes longueurs d'onde.

Les différents échantillons correspondant aux molarités 0,3 - 0,4 - 0,6 - 0,8 et 1 M de la solution de NaCl, sont testés *in vitro* sur le virus : l'éluat provenant de NaCl 0,4 M se révèle doté d'une très bonne activité antivirale (actif sur la concentration virale forte 100 DL 50), ainsi que, mais à un degré moindre, celui provenant de la concentration 1 M (faiblement actif à la concentration moyenne 10 DL 50).

Cependant, ces éluats restent encore trop impurs pour que leur spectre U.V. soit significatif.

4 - CONCLUSIONS

L'étude particulière de *Mycena galopoda* donne donc des résultats encourageants; le liquide de sa culture mycélienne semble en effet doté d'une activité spécifique contre les virus Cocksackie groupe B, mis à part le sérotype 5.

Le mode d'action du principe actif paraît relever d'une part d'un effet virulicide, d'autre part d'un effet virostatique.

L'étude chimique n'a pas encore donné de résultats significatifs, mais une expérimentation plus approfondie avec l'utilisation de levures assimilant un nombre de substrats plus réduit et plus spécifique, et avec les techniques de purification par chromatographie sur colonne de cellulose (charges ioniques) et de Séphadex (poids moléculaire) mérite d'être entreprise.

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude de l'activité antivirale de mycéliums d'Homobasidio-mycètes en culture a permis de retenir un petit nombre d'espèces actives *in vitro* sur le Cocksackievirus B. En effet, sur 231 souches fongiques testées, 9 sont capables d'inhiber le virus infectant des cellules néoplasiques en culture, tout en ne présentant aucune cytotoxicité.

L'expérimentation animale de ces neuf espèces donne des résultats très intéressants : en effet, pour les deux champignons trouvés antiviraux *in vivo* (*Mycena galopoda* et *Mycena flavoalba*), il est possible d'apprécier, non seulement l'aspect qualitatif du résultat (le souriceau est mort ou est vivant), mais aussi un aspect presque quantitatif (premiers symptômes cliniques, guérison, retard ou accélération de la mortalité).

Le liquide de culture de *Mycena galopoda*, permettant la survie de pratiquement tous les souriceaux nouveau-nés traités préventivement par le champignon, est doté d'effets virostatique et virulicide suffisamment probants pour qu'une étude particulière de cette souche fongique ait été entreprise.

L'activité du liquide de culture, variable en fonction de la composition du milieu initial, semble spécifique des Cocksackievirus du groupe B, ce qui permet de ne pas envisager de phénomène d'immunité non spécifique. L'extraction du principe actif aboutit à la mise en évidence d'une substance de poids moléculaire supérieur à 8000, probablement de nature glucidique.

Le fait d'avoir trouvé deux espèces d'Homobasidiés douées d'une activité antivirale sur les Cocksackievirus B nous incite à rechercher ultérieurement d'autres champignons présentant, en plus du pouvoir préventif, un effet curatif plus développé. Enfin, bien que cela nécessite la mise en culture de nombreuses souches cellulaires, il est indispensable de rechercher si les mycéliums de ces champignons sont capables d'inhiber le développement d'autres virus, tels que les virus poliomyélitiques, herpétiques ou les virus de la grippe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AINSWORTH (G.C.), SPARROW (F.K.) and SUSSMAN (A.S.) - 1973 -
The Fungi an advanced treatise. IV B.
(Academic Press édit., New-York and London).
- ANDO (K.), SUZUKI (S.), SAEKI (T.), TAMURA (G.), ARIMA (K.) - 1969 -
Studies on antiviral and antitumor antibiotics. XIII. Funiculosin,
a new antibiotic. 1. Isolation biological and chemical properties.
J. Antibiot., Jap., 22, 189-194.
- ANDO (K.), SUZUKI (S.), TAKATSUKI (A.), ARIMA (K.), TAMURA (G.) - 1968 -
A new antibiotic, 1 - (p-hydroxyphenyl) - 2,3 - diisocyano-4- (p-me-
thoxyphenyl) - buta - 1,3 diène. 1. Isolation and biological proper-
ties. (Studies on antiviral and antitumor antibiotics. II).
J. Antibiot., Jap., 21, 532-535.
- AKSENOV (O.A.), GOLOVIN (B.P.) and SMORODINTSEV (A.A.) - 1970 -
Antivirusnoe deistvie proizvodnykh drozdzhevoi RNK i vliyanie na
nego polikationov. [Antiviral effect of yeast RNA derivatives and
the effect of polycations] .
Vestn. akad. med. nauk. SSSR., 25, 51-58.
- BAUTE (R.), DEFFIEUX (G.), BAUTE (M.A.), FILLEAU (M.J.) et NEVEU (A.)
- 1976 -
Un nouveau métabolite fongique du groupe des épithio-3,6 dioxo-2,5
pipérazines : l'épicorazine A, isolée d'une souche d'*Epicoccum nigrum*
(Adélomycètes).
Tetrahedron Letters. 44, 3943-3944.
- BERIEL (H.) - 1970 -
Le Sarcome d'Ehrlich comme tumeur expérimentale en pharmacodynamie.
Thèse d'Etat en Pharmacie - Grenoble.

- BOIDIN (J.) - 1954 -
Essai biotaxonomique sur les Hydnées résupinées et les Corticiées.
Thèse de Doctorat ès-Sciences Naturelles, Lyon, Revue de Mycologie.
- BOURGAUX (P.), DELBECCHI (L.) and BOURGAUX-RAMOISY (D.) - 1976 -
Initiation of Adenovirus Type 2 DNA Replication.
Virology. 72, 89-98.
- BRINGUIER (J.) - 1969 -
Recherches immunologiques sur les Cocksackievirus A
Thèse d'Etat en Pharmacie, Lyon.
- BROWNING (D.R.) - 1971 -
Chromatographie. (Masson, édit. Paris).
- CUGNET (A.) - 1975 -
Activité antifongique vis-à-vis de champignons phytopathogènes de
mycéliums de Septomycètes en culture pure. Etude particulière de
Gloeophyllum striatum (Sw. ex Fr.) Murr.
Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lyon.
- CURTIS (P.J.), GREATBANKS (D.) and HEPS (B.) - 1977 -
Sirodesmins A, B, C and G, Antiviral Epipolythiopiperazine -2,5-
diones of Fungal Origin : X-Ray Analysis of Sirodesmin A Diacetate.
Journal of the Chemical Society. Perkin I : 180-189.
- GAINER (F.E.) and HUSSEY (R.L.) - 1971 -
Thin-layer chromatography (TLC) of mycophenolic acid and related
compounds.
J. Chromatogr. 54, 446-448.
- GAMOTY (L.) - 1970 -
Recherches sur les substances antibiotiques élaborées par le mycélium
de *Clitopilus pinsitus*.
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lyon.
- GERMAN (A.), LAMAISSON (J.L.) et POURRAT (H.J.) - 1974 -
Glycoprotéine à action antivirale retirée des carpophores du
Psalliota xanthoderma Genev.
Brevet français, 2 décembre 1974.

- KATO (A.), ANDO (K.), KIMURA (T.), TAMURA (G.), ARIMA (K.) - 1969 -
Isolation and characterization of paecilomycerol, a new steroidal
antiviral antibiotic. Studies on antiviral and antitumor antibiotics. XXI.
J. Antibiot., Jap., 22, 419-422.
- KATO (A.), SAEKI (T.), SUZUKI (S.), ANDO (K.), TAMURA (G.), ARIMA (K.)
- 1969 -
Oryzachlorin, a new antifungal antibiotic. (Studies on antiviral
and antitumor antibiotics. XVIII).
J. Antibiot., Jap., 22, 322-326.
- KOVALENKO (O.H.), BOBYR (A.D.), VOTSELKO (S.K.) and DYACHOK (V.V.)
- 1974 -
Antyvirusni rehovyny z drizhdzhiv *Saccharomyces cerevisiae* i
Sacch. carlsbergensis. [Antiviral substances from the yeast
Saccharomyces cerevisiae and *Saccharomyces carlsbergensis*].
Mikrobiol. Zh. (Kiev). 36, 191-196.
- KÜHNER (R.) - 1938
Le genre *Mycena*
(P. Lechevalier édit., Paris).
- KÜHNER (R.) et ROMAGNESI (H.) - 1953 -
Flore analytique des Champignons Supérieurs (Agarics, Bolets,
Chanterelles).
(Masson édit. Paris).
- LAMAISSON (J.L.) - 1974 -
Recherches sur les constituants protéiniques des Macromycètes.
Thèse d'Etat en Pharmacie, Clermont-Ferrand.
- LEDINKO (N.) - 1971 -
Inhibition by alpha amanitin of adenovirus 12 Replication in
human embryo kidney cells and of adenovirus transformation of
hamster-cells.
Nat. New Biol. 223, 247-248

- MAMMETTE (A.) - 1971 -
Virologie à l'usage des étudiants en médecine.
2ème édition (Crouan et Roques, édit., Lille).
- MERRYMAN (P.), JAFFE (I.A.) and EHRENFELD (E.) - 1974 -
Effect of D-Penicillamine on poliovirus replication in HeLa cells.
J. Virol., U.S.A., 13, 881-887.
- MILLER (P.A.), TROWN (P.W.), FULMOR (W.), MORTON (G.O.) and KARLINGER (J.) - 1968 -
An epidithiopiperazinedione antiviral agent from *Aspergillus terreus*.
Biochemical and biophysical research communications, 33, 219-221.
- NOTO (T.), SAWADA (M.), ANDO (K.) and KOYAMA (K.) - 1969 -
Some biological properties of mycophenolic acid.
J. Antibiot., Jap., 22, 165-169.
- ODDOUX (L.) - 1956 -
Influence de l'agitation du milieu de culture sur la formation de substances antibiotiques par le mycélium de divers Homobasidiés.
Lyon Pharmaceutique, 7, 183-190.
- ODDOUX (L.) - 1957 -
Recherche sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie, Cytologie, Exigences alimentaires.
Thèse de Doctorat ès-Sciences Naturelles, Lyon. (Patissier édit., Trévoux).
- ODDOUX (L.) - 1960 -
Activité antibiotique de Mycéliums d'Homobasidiés en culture pure.
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lyon. (Patissier édit., Trévoux).
- OXFORD (A.E.), RAISTRICK (H.) et SIMONART (P.) - 1939 -
Studies in the biochemistry of micro-organisms. Griseofulvin
 $C_{17}H_{17}O_6Cl$, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*.
Biochem. J., 33, 240.

- PLANTEROSE (D.N.) - 1969 -
Antiviral and cytotoxic effects of mycophenolic acid.
J. Gen. Virol., G.B., 4, 629-630.
- PLANTEROSE (D.N.), BIRCH (P.J.), PILCH (D.J.F.) and SHARPE (T.J.)
- 1970 -
Antiviral activity of double stranded RNA and virus-like particles from *Penicillium stoloniferum*.
Nature, London, 227, 5257.
- RANDERATH (K.) - 1964 -
Chromatographie sur couche mince. (Gauthier-Villars, édit., Paris).
- SHAW (A.) - 1972 -
Activité antibiotique (antibactérienne et antifongique) des mycéliums de Septomycètes en culture pure.
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lyon.
- SOHIER (R.) - 1964 -
Diagnostic des maladies à virus (Flammarion édit., Paris).
- SUZUKI (S.), KIMURA (T.), SAITO (F.) and ANDO (K.) - 1971 -
Antitumor and antiviral properties of penicillic acid.
Agric. biol. Chem., Jap., 35, 287-290.
- TAKATSUKI (A.), SUZUKI (S.), ANDO (K.), TAMURA (G.) and ARIMA (K.)
- 1968 -
New antiviral antibiotics; xanthocillin X mono - and dimethyl-ether, and methoxy - xanthocillin X dimethyl ether. 1. Isolation and characterization. (Studies on antiviral and antitumor antibiotics. V).
J. Antibiot., Jap., 21, 671-675.
- TAKATSUKI (A.), SUZUKI (S.), ANDO (K.), TAMURA (G.) and ARIMA (K.)
- 1969 -
Studies on antiviral and antitumor antibiotics. XII. Effect of geodin on virus multiplication.
Agric. biol. Chem., Jap., 33, 1119-1123.

- TAKATSUKI (A.), TAMURA (G.), ARIMA (K.) - 1968 -
New antiviral antibiotics; xanthocillin X mono - and dimethyl-ether
and methoxy - xanthocilline X dimethylether. 2. Biological aspects
of antiviral activity. (Studies on antiviral and antitumor anti-
biotics. VI).
J. Antibiot., Jap., 21, 676-680.
- TAKATSUKI (A.), TAMURA (G.) and ARIMA (K.) - 1969 -
Mode of action of xanthocillin X mono methylether on multiplication
of Newcastle disease virus in cultured cells. (Studies on antiviral
and antitumoral antibiotics. XV).
J. Antibiot., Jap., 22, 151-160.
- TAKATSUKI (A.), TAMURA (G.) and ARIMA (K.) - 1969 -
Mode of action of trichothecin on multiplication of Newcastle di-
sease virus in cultured cells. (Studies on antiviral and antitu-
moral antibiotics. XVII).
J. Antibiot., Jap., 22, 241-247.
- TAKATSUKI (A.), TAMURA (G.) and ARIMA (K.) - 1969 -
Antiviral and antitumor antibiotics. XIV. Effects of ascochlorin
and other respiration inhibitors on multiplication of Newcastle
disease virus in cultured cells.
Appl. Microbiol., U.S.A., 17, 825-829.
- TAKEMOTO (K.K.) and SPICER (S.S.) - 1965 -
Effects of natural and synthetic sulfated polysaccharides on virus
and cells.
Ann. New York Acad. Sci., 105, 365-373.
- WILKINS (W.H.) - 1945 -
Investigation into the production of bacteriostatic substances by
fungi. Cultural work on Basidiomycetes.
Trans. Brit. Mycol. Soc., 28, 110-114.

- WILKINS (W.H.) and HARRIS (G.C.M.) - 1944 -
Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. VI. Examination of the larger Basidiomycetes.
Ann. Appl. Biol., 31, 261-270.
- WILKINS (W.H.) and PARTRIDGE (B.) - 1950 -
Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the tenth 100 species, all Basidiomycetes and review of first 500 Basidiomycetes.
Brit. Journ. Exp. Path., 31, 754-758.
- WILLIAMS (R.H.), LIVELY (D.H.), De LONG (D.C.), CLINE (J.C.), SWEENEY (M.J.), POORE (G.A.) et coll. - 1968 -
Mycophenolic acid. Antiviral and antitumor properties.
J. Antibiot., A, Jap., 21, 463-464.

-----00000000-----

3. Interprétation des résultats.Discussion.	66
3.1. espèces cytotoxiques	66
3.2. espèces à activité anti-Coxsackie B ₁	68
DEUXIEME PARTIE : ETUDE <i>IN VIVO</i> DES MYCELIUMS ACTIFS <i>IN VITRO</i> SUR LES COXSACKIEVIRUS B ₁	71
CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES	73
A. MATERIEL D'ETUDE	75
1. Choix de l'animal	75
2. Préparation des liquides de culture de champignons trouvés actifs lors du cri- blage sur cellules	76
B. METHODES UTILISEES	77
1. Choix de la méthode d'inoculation de la souche virale à l'animal	77
1.1. voie sous-cutanée	77
1.2. voie intra-péritonéale	77
1.3. voie intra-crânienne	78
2. Signes cliniques dûs à l'infection par les Coxsackievirus B	79
3. Préparation de l'inoculum infectieux	79
4. Essais des liquides de culture fongique..	80
CHAPITRE II. RESULTATS	85
1. Résultats et interprétation	87
2. Discussion des résultats des études <i>in vivo</i>	106

TROISIEME PARTIE : ETUDE PARTICULIERE DE <i>Mycena galopoda</i> (Pers. ex Fr.) Kummer	113
CHAPITRE I. DESCRIPTIONS DU CARPOPHORE ET DU MYCELIUM EN CULTURE	115
CHAPITRE II. RECHERCHE DE LA METHODE DE CULTURE OPTIMALE EN VUE DE L'ACTIVITE ANTICOXSACKIEVIRUS B ...	119
1. Influence des milieux de culture	121
1.1. composition et préparation de diffé- rents milieux de culture	121
1.2. ensemencement du mycélium	124
1.3. résultats et discussions	124
2. Influence des conditions de culture	126
2.1. matériel utilisé	127
2.2. préparation de la mère	127
2.3. ensemencement proprement dit	127
2.4. expérimentation et résultats	128
3. Cinétique d'apparition de l'activité anti- virale	129
3.1. méthode utilisée	129
3.2. résultats	130
CHAPITRE III. ETUDES BIOLOGIQUE ET CHIMIQUE DU LIQUIDE DE CULTURE	133
1. Etude de la toxicité	135
2. Recherche d'une activité antivirale sur d'autres virus que le Cocksackievirus B ₁	136
2.1. essais sur les Cocksackievirus B	136

TABLE DES MATIERES

PREFACE	4
PREMIERE PARTIE : RECHERCHE SYSTEMATIQUE <i>IN VITRO</i> D'UNE ACTIVITE ANTIVIRALE	9
CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES	13
A. MATERIEL D'ETUDE	15
1. Espèces de champignons étudiés	15
2. Virus utilisé	27
2.1. description sommaire; rappels	28
2.2. syndromes cliniques sommaires; rappels	29
B. METHODES UTILISEES	30
1. Culture du mycélium	30
1.1. entretien des souches	30
1.2. matériel et milieux utilisés	31
1.3. ensemencement	32
2. Obtention du liquide à tester	33
2.1. séparation du mycélium du liquide de culture	33
2.2. stérilisation	33
3. Support vivant pour l'étude du virus	35
3.1. choix des cellules en culture	35
3.2. le matériel utilisé et sa prépa- ration	35
3.3. composition et préparation des milieux	37

3.3.1. préparation de la solution de HANKS	38
3.3.2. préparation de la solution de trypsine à 0,25 %	39
3.3.3. milieux de croissance utilisés	40
3.4. entretien de la souche	42
4. Préparation de la suspension virale	44
4.1. entretien de la souche virale ...	44
4.2. titration sur cellules	45
4.3. choix des dilutions à utiliser pour les tests	46
5. Méthodes de criblage	47
5.1. matériel utilisé	47
5.2. mode opératoire	48
CHAPITRE II. RESULTATS	53
1. Examen des plaques	55
1.1. aspect des colonnes 1 et 12	55
1.2. aspect des colonnes 2 et 3	55
1.3. aspect des autres colonnes	56
2. Résultats	57
2.1. espèces non cytotoxiques vis-à-vis des cellules KB et inactives vis-à-vis du Cocksackie virus B ₁ ..	57
2.2. espèces à effet cytotoxique	64
2.3. espèces non cytotoxiques et à activité anti-Cocksackie B ₁	65

2.1.1. étude <i>in vitro</i>	137
2.1.2. étude <i>in vivo</i>	138
2.1.2.1. essai sur le sérotype B ₂	138
2.1.2.2. essai sur le sérotype B ₃	139
2.1.2.3. essai sur le sérotype B ₄	139
2.1.2.4. essai sur le sérotype B ₅	140
2.1.2.5. essai sur le sérotype B ₆	140
2.2. essai du liquide fongique sur quel- ques Cocksackievirus groupe A	141
2.3. recherche d'une activité antiher- pétique	142
2.4. discussion	142
3. Essais d'extraction et de purification ...	143
3.1. obtention du liquide de culture ..	143
3.2. essais d'extraction par divers solvants organiques	144
3.2.1. mode opératoire	144
3.2.2. résultats	145
3.2.3. conclusions	146
3.2.4. extraction par la méthyliso- butylcétone	147
3.3. essais de séparation par d'autres procédés	150
3.3.1. dialyse	150
3.3.2. essai d'élimination biolo- gique des sucres	152
3.3.3. purification par chromato- graphie sur colonne de cel- lulose	153

4. Conclusions	155
CONCLUSIONS GENERALES	157
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159

